Untersuchungen über Faktoren, welche die Wirksamkeit einer intranasalen Impfung gegen Tetanus beim Pferd beeinflussen können

Dieter Haßlacher

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547028_0076

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. Anton Mayr

Untersuchungen über Faktoren, welche die Wirksamkeit einer intranasalen Impfung gegen Tetanus beim Pferd beeinflussen können.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Dieter Haßlacher
aus
Castrop-Rauxel

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. Dr.h.c. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. M.J. Forstner

Tag der Promotion: 27. Februar 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Seite

Inhaltsübersicht

Einleitung 1

Schrifttum: 2

1. Vorkommen und Verbreitung von C. tetani 2
2. Pathogenese des Tetanus 5
2.1. Infektion 5
2.2. Vermehrung und Toxinbildung 7
2.3. Freisetzung des Tetanus-Toxins 9
2.4. Struktur des Tetanus-Toxins und seine Bindung an die Nervenzelle 10
2.5. Ausbreitung des Tetanus-Toxins 14
2.6. Wirkung des Tetanus-Toxins 18
2.6.1. Zelluläre Wirkung 18
2.6.1.1. Wirkung auf Muskelzellen 18
2.6.1.2. Wirkung auf Nervenzellen 19
2.6.2. Systemische Wirkung 20

Eigene Untersuchungen 23

1. Material und Methoden 23
1.1. Versuchstiere 23
1.2. Impfstoff 23
1.3. Immunisierungsverfahren 23
1.4. Impfdosis 24
1.5. Blutentnahme 24
1.6. Gewinnung der Sera 24
1.7. Indirekte Hämagglutination 25
1.7.1. Behandlung der Sera 25
1.7.2. Antigen 25
1.7.3. Sensibilisierung der Hammelerythrozyten 25
1.7.4. Durchführung des Testes 25
1.8. Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) 26
1.8.1. Puffer 26
1.8.2. Beschichtung der Platten 26
1.8.3. Konjugat 26

Seite

1.8.4. Indikator 27
1.8.5. Durchführung des Testes 27
1.8.6. Ablesung 27
1.9. Aktiver Mäuseschutzversuch 28

2. Ergebnisse 29
2.1. Vergleich der Empfindlichkeit zwischen indirekter Hämagglutination und ELISA für die Tetanus-Antitoxinbestimmung 29
2.2. Unschädlichkeitsuntersuchung 30
2.3. Wirksamkeitsuntersuchung 31

Besprechung der Ergebnisse 47

Zusammenfassung und Summary 51

Literaturverzeichnis 55

Lebenslauf 71

Einleitung

Gegen Tetanus ist bisher ausschließlich auf intramuskulärem Wege geimpft worden. Modellversuche an Pferd, Hund und Mensch haben bewiesen, daß auch eine Immunisierung auf intranasalem Weg möglich ist. Die ersten Ergebnisse mit der intranasalen Impfung waren so vielversprechend, daß dieses neue Impfverfahren möglicherweise als Alternative zur herkömmlichen intramuskulären Impfung in Betracht gezogen werden kann. Neben der einfachen und problemlosen Handhabung hat die intranasale Impfung vor allem den Vorteil, daß die Gefahr von lokalen Impfreaktionen, wie sie nach intramuskulären Impfungen immer wieder beobachtet werden, nicht besteht.

Die Praxisreife kann aber der intranasalen Impfung gegen Tetanus nach diesen ersten Modellversuchen an begrenzten Probandenzahlen noch nicht bescheinigt werden. Vor der breiten Anwendung müssen noch Fragen bezüglich der optimalen, nasalen Impfdosis, der praktikabelsten nasalen Applikationsmethode, der besten Impfstoffzubereitung usw. geklärt werden. Auch ist es notwendig, die Unschädlichkeit der intranasalen Impfmethode an größeren Tierzahlen zu untermauern.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die wichtigsten Faktoren, welche die Wirksamkeit der intranasalen Impfung gegen Tetanus beim Pferd beeinflussen können im einzelnen untersucht. Dabei wurde vor allem Wert auf große Probandenzahlen gelegt, um eine fundierte Aussage bezüglich der Unschädlichkeit der intranasalen Impfung zu bekommen.

Schrifttum

1. Vorkommen und Verbreitung von C. tetani

Clostridium tetani (C. tetani)-Bakterien sind auf der ganzen Welt (ubiquitär) verbreitet, wobei sie in der Regel nicht in der vegetativen, sondern in der versporten Form vorkommen. C. tetani-Sporen findet man vor allem im Darmtrakt von Mensch und Tier sowie im Boden, bevorzugt in der Umgebung von menschlichen und tierischen Behausungen (Wilson u. Miles; Sergeeva u. Matveev). Bakteriologische Untersuchungen von Bodenproben in den USA (Smith) und UDSSR (Sergeeva u. Matveev) ergaben eine relativ gleichmäßige Verteilung der Tetanus-Sporen. Die Sporenzahl war unabhängig von der Bodenbeschaffenheit und dem Klima der jeweiligen untersuchten repräsentativen Gebiete (Smith). Frühere Untersuchungen dokumentierten einen direkten Zusammenhang zwischen der C. tetani-Sporenzahl im Boden und der Morbiditätsrate bei Mensch und Tier (Sergeeva u. Matveev). In neueren Untersuchungen konnte eine derartige Korrelation nicht bestätigt werden (Kubiny und Lendvai).

Die Häufigkeit der Tetanus-Erkrankungen kann dagegen mit anderen Faktoren in Zusammenhang gebracht werden, nämlich mit der natürlichen Resistenz und dem Immunstatus des einzelnen Menschen bzw. Tieres. Es ist schon seit langem bekannt, daß artbedingte Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dem Tetanustoxin bestehen. Am empfindlichsten sind Pferd, Mensch, Affe und Meerschweinchen, weniger empfindlich sind Rind, Schaf, Ziege, Maus, Katze, Hund und Geflügel. Als Erklärung für die verschieden starke Empfindlichkeit der einzelnen Spezies werden folgende Ursachen diskutiert:

1. Unterschiede in den Tetanus-Toxin-Rezeptoren bzw. in der Affinität des Toxins zu den Rezeptoren,

2. Unterschiede im Reflexmechanismus des Rückenmarks und

3. Ursache 1 und 2 zusammen.

Mit Einführung der Schutzimpfung gegen Tetanus, können auch für Tetanus empfängliche Spezies, wie Mensch und Pferd, wirkungsvoll vor der Tetanus-Erkrankung geschützt werden. Die Tetanus-Quote ist dadurch vor allem in den Industrieländern stark zurückgegangen. Der größte Teil der jährlich gemeldeten Tetanusfälle entfällt aufgrund mangelnder medizinischer Versorgung bzw. mangelnder Tetanus-Impfungen und sozio-ökonomischer Gegebenheiten auf die Entwicklungsländer (Rey et al.). Die Jahresstatistik der Weltgesundheitsorganisation berichtete 1971 von 8.816 an Tetanus gestorbenen Menschen. Dabei entfielen 44,5% auf Afrika, 33,7 % auf Asien und 13,4 % auf Europa. Besonders hoch ist die Zahl an Tetanustoten (3.183) auf den Philippinen und (1.041) in Thailand. In der Bundesrepublik Deutschland sind 1971 dagegen nur 64 Menschen an Tetanus gestorben. Bei diesen Angaben muß jedoch bedacht werden, daß Tetanus in der Hälfte der Weltstaaten nicht registriert wird und in vielen WHO Mitgliedsstaaten die Statistik nur einen Teil der Population (z.B. Krankenhauspatienten) erfaßt (World Health Statistic Annual 1971; WHO Weekly Epidemiological Report).

Bytchenko schätzt die Dunkelziffer bei Tetanus auf mindestens 64.000 pro Jahr und beziffert die jährlichen Tetanustoten auf etwa 160.000 Menschen. In manchen tropischen Gebieten ist Tetanus neonatorum (Erkrankungen bei Kindern bis zum Alter von 28 Tagen) bei 80 von 1.000 Lebendgeburten die Haupttodesursache (Veronesi; Mattos).

Absolute Zahlen über die Tetanus Fälle beim Tier sind sehr selten, da Tetanus nicht zu den anzeige- oder meldepflichtigen Erkrankungen zählt. Aus einem japanischen Gebiet be-

richtete Sakurai von 373 Tetanusfällen bei Haustieren in einem Zeitraum von 80 Jahren. Die meisten Fälle (240) ereigneten sich beim Schwein und beim Pferd (59). Berger registrierte dagegen beim Hund weltweit nur 135 Fälle in 126 Jahren (1851-1977).

Da es in den Industrieländern in den letzten Jahren zu einer gewissen Impfmüdigkeit kam, ist auch hier mit einem Anstieg der Tetanusfälle zu rechnen. Diese Impfmüdigkeit ist vor allem bei Tetanus sehr kritisch, da wir hier nicht mit einem Populationsschutz, sondern nur mit einem Individualschutz rechnen können. Finger et al. untersuchte in repräsentativen Stichproben die Immunitätssituation bezüglich Tetanus in der Bundesrepublik Deutschland. Dabei stellten die Untersucher fest, daß 85 % der älteren Menschen (über 60 Jahre) keine oder unter dem Schutzwert von 0,01 IE/ml Serum liegende Antitoxintiter aufwiesen und somit nicht gegen Tetanus geschützt waren.

Von einer neuen Infektionsquelle für Tetanus wurde aus New York berichtet, wo in letzter Zeit hauptsächlich Rauschgiftsüchtige an Tetanus erkrankten (Cherubin). Verunreinigungen des Rauschgifts und Unsterilitäten bei der Injektionstechnik sollen dafür verantwortlich sein. Begünstigend für die Entwicklung des Tetanus wirkt sich dabei oftmals die gleichzeitige Injektion von Eitererregern und C. tetani Sporen aus. Als Infektionsquelle dient vor allem das Chininpulver, das häufig mit Heroin vermischt wird und das sehr viele C. tetani-Sporen enthält (Russel Martin; Blake u. Feldmann).

Im Zusammenhang mit der Immunitätssituation gegen Tetanus sind neuere Untersuchungen interessant, die erstmals nachweisen, daß für Tetanus empfängliche nicht geimpfte Personen und Tiere Antitoxine gegen Tetanus besitzen können. Veronesi et al. wies bei 34 % der nicht geimpften Landarbeiter und Gärtner in Brasilien Antitoxintiter nach, die über dem Schutzwert von 0,01 I.E./ml Serum lagen.

Auch bei nicht geimpften Tieren (Pferde, Rinder, Schweine, Hunde und Meerschweinchen) in Brasilien wurden Tetanus Antitoxintiter (≥ 0,01 U/ml) im Serum nachgewiesen. Von Byttycharyga et al. liegen ähnliche Ergebnisse aus Rußland vor. Sie konnten bei verschiedenen, nicht geimpften Tieren (Büffeln, Rindern, Kamelen, Hunden, Fohlen, Ziegen, Meerschweinchen, Mäusen, Schweinen, Kaninchen, Schafen in Indien) Titer zwischen 0,002 und 0,064 I.E./ml im Serum nachweisen. Basova et al. fand bei wildlebenden Gerbilarten in bestimmten Gegenden der UDSSR sogar Antitoxintiter bis zu 20-50 I.E./ml im Serum.

Diese Ergebnisse sind überraschend, da bisher bei Tetanus eine Infektionsimmunität als unmöglich angesehen wurde (Eckmann). Man ging davon aus, daß Tetanussymptome durch eine so geringe Toxinmenge ausgelöst werden, die nicht ausreicht, während der kurzen Krankheitsdauer das Immunsystem zu stimulieren; vor allem auch deshalb nicht, weil das meiste Toxin sofort an die Ganglioside der Nervenzellen gebunden wird (Veronesi et al.). Wie die eben beschriebenen nicht postvakzinalen Antitoxintiter zustande kommen, konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Man diskutiert, ob vielleicht die toxische Komponente von im Darmtrakt befindlichen Tetanus-Toxin durch Enzyme oder Gase zerstört wird, die antigene Komponente aber erhalten bleibt, persorbiert wird und dann die Antitoxinbildung stimuliert (Veronesi et al.).

2. Pathogenese des Tetanus (vgl. Abb. 1)

2.1. Infektion

Der Tetanus Erkrankung geht meist eine Wundinfektion mit C. tetani-Sporen voraus, wobei die Wunden manchmal so geringfügig sind, daß sie kaum bemerkt werden. Die häufigsten Eintrittspforten sind der Nabel bei Neugeborenen, Operations-

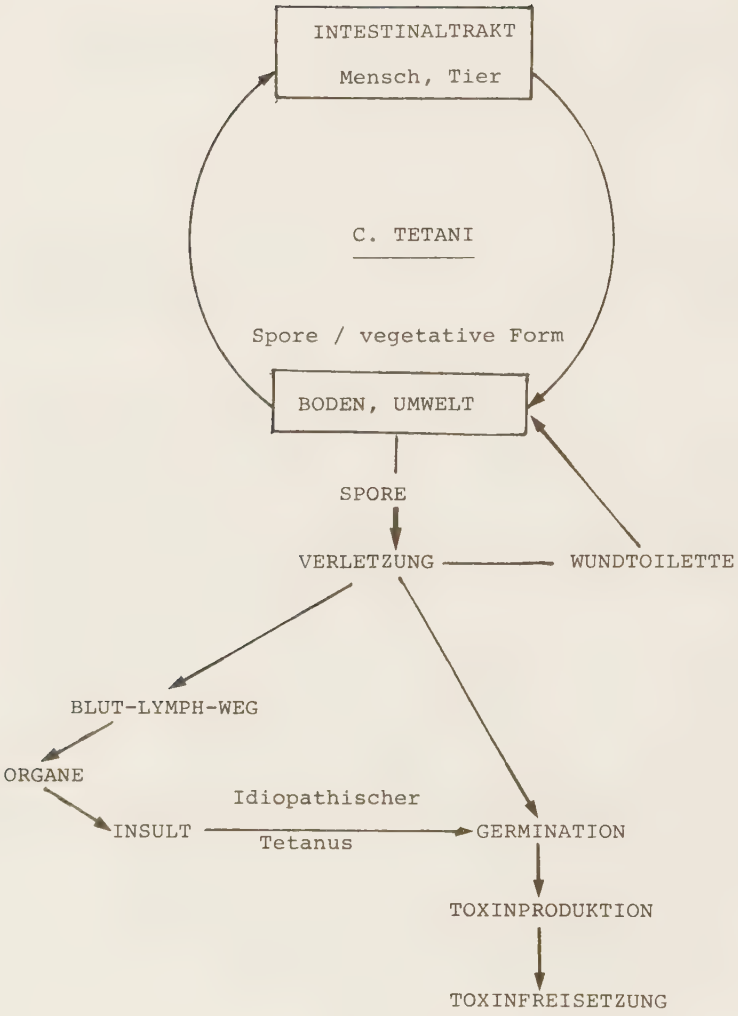


Abb. 1 : Allgemeiner Überblick über die Pathogenese der Tetanus Infektion

wunden oder Stichverletzungen. C. tetani-Sporen, die über zerstörtes Gewebe und zerstörte Gefäße in den Blut- oder Lymphstrom gelangen, werden in alle Organe, insbesondere in Leber und Milz transportiert (Kalich). Diese Sporen können jederzeit auskeimen und Ursache des idiopathischen oder kryptogenen Tetanus sein, bei dem sich anamnestisch in der (kürzeren) Vergangenheit keine Verletzung nachweisen läßt. Nur unter relativ seltenen Voraussetzungen kann Tetanus auch aus dem Darmkanal entstehen (Kalich). Bei einer intakten Darmflora werden oral aufgenommene Tetanuserreger nach 8-14 Tagen ausgeschieden, ohne zu einer Erkrankung zu führen. Besteht aber eine Dünndarmentzündung, so können C. tetani-Keime aus dem Darm in die Blutbahn gelangen.

Erreichen sie von dort einen Ort mit anaeroben Verhältnissen, z.B. wenn eine Gewebeschädigung (Quetschwunde oder fehlerhafter Hufbeschlag) vorliegt, keimen die Sporen aus und produzieren Toxin. Der Krankheitsverlauf und die Inkubationszeit sind in diesen Fällen meist wesentlich kürzer.

2.2. Vermehrung und Toxinbildung

Die wichtigste Voraussetzung für die Auskeimung der Sporen und Vermehrung der vegetativen Keime ist ein tiefes Redoxpotential im sporenkontaminierten Gewebe (Regamey; Shoessmith u. Holland). Da der Sauerstoff von außen kaum mehr als einen Millimeter in das Gewebe hineindiffundieren kann, muß, sobald die kapillare Vaskularisation gestört ist, sofort mit anaeroben Verhältnissen gerechnet werden (Schebitz/Brass). Eine ungünstige Rolle spielen dabei Mischinfektionen mit sauerstoffzehrenden kompetetiven Bakterien oder eine traumatisch bedingte Hämostase (Kalich). Dagegen wird das Auftreten des Starrkrampfes bei gleichzeitiger Infektion mit B. subtilis behindert (Kalich).

Nach Auskeimen der C. tetani-Sporen bilden die vegetativen Keime lokal das Tetanus-Toxin. Shmith u. Mc Iver untersuchten bei Mäusen den Zeitraum zwischen Tetanus-Infektion, Auftritt der ersten Tetanuserscheinungen und Tod der Tiere. Mäuse, denen 1.200 Tetanus-Sporen intramuskulär verabreicht wurden, zeigten nach 20 Stunden die ersten Tetanus Symptome und starben 17 Stunden später. Bei Mäusen, denen dagegen schon das Tetanus-Toxin (2MLD*) injiziert wurde, traten Tetanus Symptome nach 13 Stunden auf. Der Tod dieser Tiere trat ebenfalls 17 Stunden später ein. Folglich benötigen 1.200 Sporen nur 7 Stunden um auszukeimen und 2 MLD Tetanus-Toxin zu bilden. Gleichzeitige Keimzählungen an der Injektionsstelle ließen in diesem Zeitraum keine wesentliche Vermehrung der C. tetani-Keime erkennen. Es genügen also nur wenige vegetative Keime um tödliche Tetanustoxinmengen zu produzieren. Wegen der relativ kurzen Zeit zwischen Sporeninjektion und Auftreten der Tetanus-Symptome wurde auch diskutiert, ob in den Sporen nicht schon Tetanus-Toxin enthalten ist. Beweise hierfür konnten aber bisher nicht erbracht werden.

Das Tetanus Toxin wird während der exponentiellen Wachstumsphase nur in sehr geringen Mengen gebildet. Das meiste Toxin entsteht am Ende der Wachstumsphase. Nach Lettl und Mitarbeiter findet die Synthese des Tetanus-Toxins in der Bakterienzelle erst während der Autolyse statt. Begünstigend für die Toxinfreisetzung wirkt sich die Zufuhr von Sauerstoff aus (van Wezel). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Bakterienzelle in diesem Stadium enthüllten bei toxinogenen Stämmen zusätzliche intrazytoplasmatische, granulo-membranöse Strukturen, in deren Umgebung sehr viele Polyribosomen gefunden wurden (Volgin et al.). Pavlova u. Sergeeva vermuten einen Zusammenhang zwischen der Toxinbildung und diesen Strukturveränderungen. Ähnliche Strukturveränderungen wurden aber auch bei sich teilenden und sporulierenden Bakterien beschrieben (Nischida et al.), so daß möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Toxinbildung

---

*MLD = Minimale Letale Dosis

und Sporulation besteht bzw. einige gemeinsame Schritte im Toxinbildungs- und Sporulationsprozeß vorhanden sind (Pavlova u. Sergeeva).

Das neu gebildete Toxin wird zunächst in Granula außerhalb und innerhalb der lysierten Bakterienzelle abgelagert (Volgin et al.). Die produzierte Toxinmenge kann bis zu 10 % des gesamten Bakterienzellgewichts betragen (Hara et al.).

Über die Synthese des Tetanus-Toxins im einzelnen gibt es bisher nur Modellvorstellungen: Durch das rapide Zellwachstum in der exponentiellen Wachstumsphase tritt eine Nährstoffverknappung, insbesondere ein Mangel an Aminosäuren ein. Als Folge wird die Proteinsynthese in der Zelle in Richtung Toxinbildung umgestellt (Mellanby). Dabei kommt es auch zur Bildung neuer messenger RNS, bevor an den Ribosomen andere Eiweißstoffe synthetisiert werden (Coleman, Coleman et al.).

Das Toxinbildungsvermögen der verschiedenen C. tetani-Stämme ist sehr unterschiedlich. Hara und Mitarbeiter vermuten daher, daß die Toxinproduktion ein Plasmid kontrolliert, welches möglicherweise durch einen Bakteriophagen übertragen wird. Dafür spricht auch die Tatsache, daß C. tetani-Stämme durch mehrere Passagen in flüssigen Nährböden die Eigenschaft der Toxinbildung verlieren können (Nielsen 1966). Nach Nielsen (1969) ist dagegen der Verlust des Toxinbildungsvermögens auf eine biochemische Mutation oder auf eine Veränderung (Modifikation) des Zellwandrezeptormechanismus zurückzuführen.

2.3. Freisetzung des Tetanus-Toxins

Der Mechanismus für die Freisetzung bzw. Ausschleusung des

intrazellulären Tetanus-Toxins aus der Bakterienzelle in die Umgebung ist noch nicht ganz geklärt. Man weiß nur, daß das intrazelluläre Toxinmolekül bei der Ausschleusung gespalten und in extrazelluläres Toxin überführt wird. Die Spaltung des intrazellulären Toxinmoleküls zum extrazellulärem Toxinmolekül kann künstlich z.B. durch Trypsinbehandlung des intrazellulären Toxins nachvollzogen werden (Matsuda u. Yoneda). Helting et al. (1979) isolierte aus C. tetani-Bakterien eine Protease mit der ebenfalls intrazelluläres in extrazelluläres Toxin übergeführt werden kann. Das von ihnen gefundene Enzym entwickelte fibrinolytische Aktivität und wurde nicht durch Trypsininhibitoren gehemmt.

Im Widerspruch zu diesen neueren Ergebnissen stehen die Befunde von Willis und Williams, und Williams die bei 71 untersuchten C. tetani-Stämmen keinen einzigen fanden, der proteolytische Aktivitäten aufwies. Verwirrend ist, daß auch die proteolytische Aktivität in den verschiedenen Kulturfiltraten sehr stark variiert (Bizzini und Raynaud, Willis und Williams, Williams,Bizzini et al. 1977).

2.4. Struktur des Tetanus Toxins und seine Bindung an die Nervenzelle

Tetanus-Toxin besteht aus zwei verschiedenen Molekularformen, nämlich dem intrazellulären und dem extrazellulären Toxin. Extrazelluläres Toxin unterscheidet sich vom intrazellulären Toxin durch die Spaltung einer Peptidbrücke. Die beiden Fragmente des extrazellulären Tetanus-Toxins werden durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten (Bizzini 1979; Matsuda u. Yoneda).

Tetanus-Toxin ist ein Protein mit einem mittleren Molekulargewicht von 150.000. Das Toxin enthält sechs freie

SH-Gruppen und zwei Disulfidbrücken. Über das Strukturmodell herrscht derzeit noch Uneinigkeit. Zwei Modelle sind in der Diskussion. Bizzini und Mitarbeiter (1973) nehmen an, daß das Tetanus-Toxin-Molekül aus zwei identischen Untereinheiten (Ketten) mit einem Molekulargewicht von je 75.000 besteht, wobei jede Untereinheit von zwei Ketten gebildet wird, von denen die eine ein Molekulargewicht von 50.000 und die andere ein Molekulargewicht von 25.000 besitzt. Beide Ketten sind durch Disulfidbrücken verbunden. Nach Craven und Dawsen sowie Matsuda und Yomeda besteht das intrazelluläre Toxin aus einer einzigen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 150.000, die in eine schwere Kette von 100.000 und in eine leichte Kette von 50.000 gespalten wird (Abb. 2).

Durch Behandlung des Tetanus-Toxins mit Enzymen (Helting und Zwisler; Matsuda und Yomeda) oder durch mehrmaliges auftauen und einfrieren (Bizzini und Raynaud 1974, 1975), konnten weitere Fragmente des Toxins isoliert und charakterisiert werden. So wurde ein Fragment C und Fragment IIb isoliert, die für die Bindung des Toxins an Ganglioside verantwortlich sind (Bizzini 1977, 1978), und eine dem Fragment B-II_b ähnliche Fraktion (als Teil der schweren Kette), die wahrscheinlich bei der Bindung des Toxins an die Rezeptoren der Nervenzelle mitwirkt (Bizzini 1977). Das Tetanus Toxins besteht zu je 20 % aus α- und ß-Helix-Strukturen (Robinson et al.).

Für die Bindung des Tetanus-Toxins dienen einmal die Ganglioside an der Nervenzelle als Rezeptoren (van Heyningen 1976, 1961). Diese Rezeptoren sind in ihrer räumlichen Struktur dem Zellrezeptor für Thyreotropin (TSH) sehr ähnlich (Ledley et al.; Habig et al.) Zimmermann weist

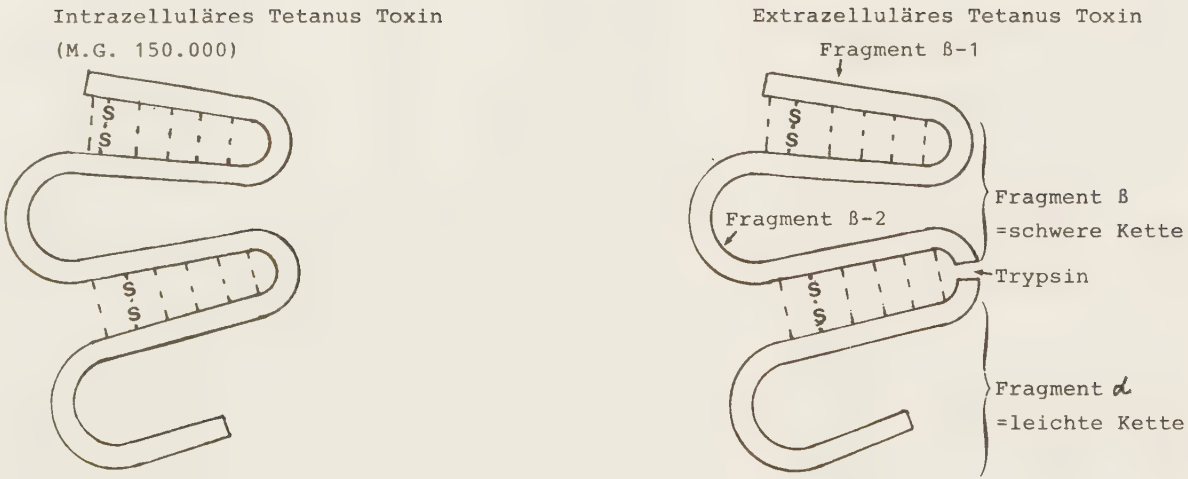


Abb. 2 : Struktur des Tetanus-Toxins und seiner Fragmente (Modifiziert nach Matsuda und Yoneda).

an den Nervenzellen zusätzlich noch drei weitere Rezeptoren mit unterschiedlicher Bindungsqualität nach:

1. eine Bindung, die N-acetylneuraminidase-abhängig ist (das Toxin kann durch Neuraminidase entfernt werden),
2. eine Bindung, die von ß-galactosid-Brücken abhängig ist (das Toxin wird durch ß-galactosidase gelöst), und
3. eine Bindung, die Neuraminidase und ß-galactosidase unabhängig ist.

Die Bindung des Toxins an die Zelle kann dabei sowohl effektiv als auch ineffektiv sein. Unter effektiver Bindung versteht man eine Bindung mit allen biologischen Konsequenzen, während bei der ineffektiven Bindung keine Toxinwirkung nachzuweisen ist (Zimmermann u. Piffaretti). Das Tetanus-Toxin kann sich nur auf eine Art - also entweder effektiv oder ineffektiv - an Zellrezeptoren binden. Verantwortlich für die effektive Bindung sollen die Rezeptoren sein, die ß-galactosidase unabhängig sind (Zimmermann und Piffaretti). Die Bindung an die Ganglioside soll ineffektiv sein (Zimmermann und Piffaretti). Mit welchem Rezeptor der Zelle das Tetanus-Toxin reagiert, hängt von verschiedenen Gründen ab, wie z.B. der Konzentration und Verteilung der Zellmembranrezeptoren oder der relativen Affinität zwischen Toxinrezeptor und Zellmembranrezeptoren (Zimmermann und Piffaretti).

Die schwere Kette des Tetanus-Toxins ist für die Bindung des Toxins an die Gangliosidrezeptoren der Nervenzellen verantwortlich, während die Toxinaktivität auf der Wirkung der leichten Kette beruht (van Heyningen 1976, Helting et al. 1977). Damit gleicht der Aufbau des Tetanus-Toxins im wesentlichen dem anderer Toxine wie z.B. dem Diphterie- und Cholera-Toxin, bei denen ebenfalls eine

der Subketten für die Bindung an die Zelle und die andere für die biologische Aktivität verantwortlich ist (van Heyningen 1978).

Durch den Nachweis der effektiven und ineffektiven Bindung von Tetanus-Toxin können frühere nicht verständliche Phänomene erklärt werden. So war es z.B. unerklärlich, daß Tetanus-Toxin im ZNS vor dem Auftreten von klinischen Symptomen und oftmals Wochen nach der Genesung noch nachweisbar war (Habermann 1972). In beiden Fällen hat es sich nach heutiten Erkenntnissen um ineffektiv gebundenes Tetanus-Toxin gehandelt.

2.5. Ausbreitung des Tetanus-Toxins

Nach der Freisetzung des Toxins aus der Bakterienzelle, gelangt es durch das benachbarte Gewebe auf noch nicht bekanntem Wege zu einer Nervenendigung. Schwab und Thoenen untersuchten die Aufnahme von kolloidalen Goldkörnern, die mit Tetanus-Toxin umschlossen waren, in Nervenendigungen in der Iris von Ratten. Dabei fanden sie, daß die Partikel selektiv an die Membranen der autonomen Nervenendigungen und der "praeterminalen" Axone gebunden wurden. Der Toxin-Gold-Komplex war hauptsächlich an den dem endoplasmatischen Retikulum ähnlichen Abteilungen, die mit der Membran verbunden waren, lokalisiert und zwar entweder als Einzelkörner oder in Reihen- oder Traubenform. Durch die Bindung des Tetanus-Toxins an die Membranrezeptoren der terminalen Nerven wird der Mechanismus zum retrograden Transport des Toxins zum ZNS ausgelöst (Bizzini et al. 1977, Schwab und Thoenen 1978).

Einen schematischen Überblick über die Ausbreitung und Wirkung des Tetanus-Toxins gibt Abb. 3.

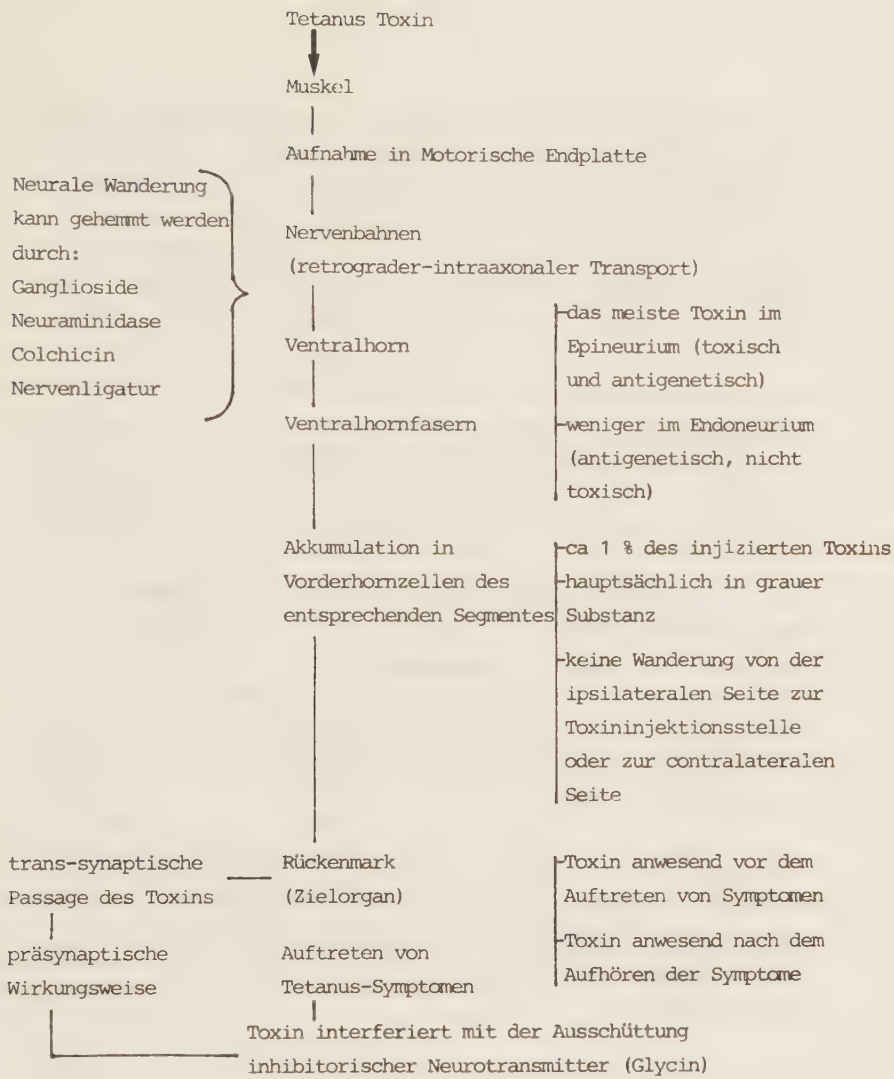


Abb. 3 : Überblick über die Ausbreitung und die Wirkungsweise des Tetanus-Toxins (Nach Bizzini 1979 und 1976).

Der Transport des Tetanus-Toxins in die motorischen Nervenzellen der Ventral-Hörner des Rückenmarks erfolgt nach Aufnahme in die Neuromuskuläre-Synapse ausschließlich in den α- und nicht in den γ- Fasern der zugehörigen Nervenaxone (Green et al. 1977). Deshalb wird das Toxin nur in den α- motorischen Neuronen gefunden, γ- Axone bleiben im wesentlichen frei von Toxin.

Auf intra-axonalem Wege wandert das Toxin in zentripetaler Richtung von der Nerverendigung entlang der Axone zum ZNS (retrograder, intra-axonaler Transport) und nicht entgegen früheren Untersuchungen in interneuralen, extraaxonalen Gewebezwischenräumen (Bizzini 1979).

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit in den Nervenfasern ist neben anderen Faktoren vor allem von der elektrischen Stimulierung abhängig (Habermann et al. 1980). Je höher die Frequenz der Aktionspotentiale ist, desto schneller wandert das Toxin. Price und Mitarbeiter errechneten eine durchschnittliche Ausbreitungsgeschwindigkeit von 75 mm pro Tag.

Obwohl das meiste Tetanus-Toxin im Rückenmark intaktes extrazelluläres Toxin ist, muß man damit rechnen, daß eine kleine Menge des Toxins in gespaltener Form, also in Fragmenten mit niedrigerem Molekulargewicht, vorliegt (Habermann et al. 1977).

Die Verteilung des Toxins im Organismus geschieht relativ rasch. Nach intravenöser Gabe war nach den Untersuchungen von Habermann und Mitarbeitern innerhalb von 30 Minuten die Hälfte des Toxins aus dem Blutkreislauf verschwunden (Habermann et al. 1973, Habermann 1973). Das

meiste Toxin wurde von der Leber aufgenommen. Der kleinere Rest war in Knochen, Muskeln und Haut verteilt. Zur selben Zeit waren nur Spuren von Toxin im Hirn und Rückenmark nachweisbar. Nach einem Tag war etwa noch 20 % des Plasmaspiegels vorhanden, während ein Großteil im Urin und Fäzes ausgeschieden wurden. Im Rückenmark und den hinteren Abschnitten des Stammhirns ließen sich weniger als 1 % des applizierten Toxins nachweisen. Cerebrum und Cerebellum waren sogar frei von Toxin.

Aufgrund des hohen Molekulargewichts kann das Tetanus-Toxin die intakte Blut-Hirnschranke nicht durchdringen (Habermann und Dimpfel, 1973; Stöckel et al. 1975; Kalich). Vielmehr wird das Toxin aus dem Blutkreislauf an verschiedenen Körperstellen von Nervenendigungen aufgenommen und retrograd ins ZNS transportiert (Dimpfel et al. 1975).

Nach Injektion in einen Muskel wird ein Teil des Toxins von der motorischen Endplatte aufgenommen und wandert zur zugehörigen ipsilateralen Seite des Rückenmarks. Es vermag nicht zur kollateralen Seite hinüberzuwechseln (Wellhöner et al.; Dimpfel et al. 1975). Über wenige Axone wandert es durch die Spinalganglien und Ventralhörner in die Halbsegmente, die den Muskel versorgen und in den das Toxin injiziert wurde (Wiegand und Wellhöner). Hier befindet es sich hauptsächlich im Perikaryon und den Dendriten. Etwas weniger liegt im Zellnukleus vor (Erdmann et al.).

Von den Motoneuronen der Ventralhörner gelangt das Tetanus-Toxin durch einen noch unbekannten Mechanismus über den synaptischen Spalt zu den ihnen benachbarten inhibitorischen Nervenendigungen (Price et al.; Schwab und Thoenen 1975). In diesen synaptischen Endkolben befindet sich das Tetanus-Toxin in der Nähe der Mitochondrien, synaptischer Membranstrukturen und anderer noch nicht identifizierter Granula (Habermann et al. 1973).

Es ist schon seit langem bekannt, daß bei klinisch manifestem Wundstarrkrampf Antitoxingaben, sowie die Verabreichung anderer Substanzen (z.B. Ganglioside, Neuraminidase), die das Tetanus Toxin zu binden vermögen, keine Besserung der Symptome bewirken. Da das Toxin irreversibel im Rückenmark gebunden wird, ist in diesem Stadium eine kausale Therapie unmöglich (Bizzini 1979).

Die Verhinderung von Tetanus-Symptomen muß daher vor der Aufnahme des Toxins in die terminalen Nervenendigungen erfolgen. Dies wird durch Toxin-neutralisierende-Antikörper verhindert (Bizzini 1976). Unter experimentellen Bedingungen wurde das Toxin auch durch Gangliosid- oder Neuraminidase-Gaben gebunden, wenn diese innerhalb von 30 Minuten nach Verabreichung des Toxins an der Eintrittspforte lokal appliziert wurden (Habermann et al. 1980). Nach dieser Zeit ist die Verteilung des Toxins nur durch eine proximale Nervenligatur oder Nervendurchtrennung aufzuhalten (Price et al.).

2.6. Wirkung des Tetanus Toxins

Trotz intensiver Untersuchungen von zahlreichen Forschern, ist es bis heute nicht gelungen, den Wirkungsmechanismus des Tetanus-Toxins in allen Einzelheiten zu klären. Die Wirkung ist komplex und kann in eine zelluläre und in eine systemische Wirkung unterteilt werden.

2.6.1. Zelluläre Wirkung

2.6.1.1. Wirkung auf Muskelzellen

Im Verlauf der Tetanuserkrankung kommt es zu Muskelatrophien aller willkürlichen Muskeln, die auf der direkten Wirkung des Tetanus-Toxins auf die Muskelzelle beruhen (Eyrich).

In der ersten Krankheitswoche sind histologisch und elektronenmikroskopisch keine pathologischen Veränderungen nachweisbar. Erst ab der zweiten Krankheitswoche stellt Eyrich in seinen Untersuchungen bioptisch entnommener Muskelproben in einem gewissen zeitlichen Ablauf pathologische Veränderungen fest. Anfangs überwiegt die vakuolige Degeneration mit hyaliner Quellung, Verlust der Querstreifung, sowie sanduhrartige Auftreibungen einzelner Muskelfasern. Elektronenoptisch zeigen die Myofibrillen häufig einen verschieden starken Kontraktionszustand. Die Z-Streifen sind zerstört. In den Mitochondrien werden kleine Vakuolen und Granula gefunden. Im Zytoplasma sind Glykogenablagerungen unregelmäßig verteilt. In der 3. - 7. Krankheitswoche schreitet die disseminierte Zenker'sche Degeneration weiter fort. Danach beginnen die Muskelzellen sich wieder zu regenerieren. Muskelgewebe von an Tetanus erkrankten Patienten regeneriert sich vollständig, so daß bei Menschen und Tieren, die die Tetanus-Erkrankung überstehen, histologisch und elektronenoptisch kein pathologischer Befund an der Muskulatur erhoben werden kann.

2.6.1.2. Wirkung auf Nervenzellen

Während das Tetanus-Toxin auf foetale Nervenzellen keine Wirkung zeigt, sind die Effekte auf differenzierte Nervenzellen in vivo und in vitro sehr vielfältig (Zimmermann).

In vitro verkürzen sich die Zellausläufer und verlieren ihre Glashaftung, sobald das Tetanus Toxin effektiv gebunden ist (Zimmermann).

An cholinergen Nervensystemen wird die Synthese von Acetylcholin (ACh) in den Synaptosomen durch das Tetanus-Toxin gehemmt (Bigalge et al. 1978). Dabei ist das für die Synthese von ACh verantwortliche Enzym Cholin-Acetyltransferase

in seiner Aktivität nicht herabgesetzt. Es wird die Cholinaufnahme in die Synaptosomen gehemmt (Wannacott und Marchbanks).

Im Rückenmark dienen nach heutigen Erkenntnissen die beiden Aminosäuren Glycin und γ-Aminobuttersäure (GABA) auf Motoneuronen als inhibitorische Neurotransmitter. Collinridge et al. schließt aus seinen Untersuchungen, daß das Tetanus-Toxin die GABA-Ausschüttung direkt hemmt.

Der Wirkungs- und Ausschleusungsmechanismus von Glycin aus den Synaptosomen ist bisher weitgehend unbekannt (Biggin 1979/1976). Für den Ausschleusungsmechanismus von Glycin ist ein Actomyosin-like-Protein (AMLP) mitverantwortlich, welches indirekt durch Interferenz auf seinen Energiehaushalt durch das Tetanus-Toxin die Glycinausschüttung hemmt (Kryzhanowsky et al.).

Einen Einfluß auf die Aktionspotentiale, Refraktionszeit und die elektrische Reizbarkeit der motorischen Neuronen hat das Tetanus-Toxin nicht (Wiegand und Wellhöner).

2.6.2. Systemische Wirkung

Die für Tetanus typischen Muskelzuckungen und Krämpfe (z.B. Sägebockstellung, Lordose, Trismus) werden durch Interferenz des Tetanus-Toxins mit den spinalen Eigenreflexbögen ausgelöst, so daß das physiologische Wechselspiel antagonistischer Muskelgruppen aufgehoben wird. Dieses führt zur maximalen Kontraktion aller beteiligten Muskeln und dadurch oftmals zu Kochen- oder Wirbelfrakturen (Kerr et al.; Wiegand und Wellhöner). Beim lokalen Tetanus ist nur eine Extremität oder eine Muskelgruppe von Krämpfen befallen.

Nachdem das Tetanus-Toxin von seiner Injektionsstelle bzw. der Freisetzung aus dem Bakterium an der Verletzungsstelle

die motorische Endplatte des betroffenen Muskels erreicht hat, und ins Rückenmark aufgestiegen ist, enthemmt es in seinem Segment den spinalen Eigenreflex der Muskulatur (Kryzhanovsky 1975). Dies führt zu einer maximalen Muskelkontraktion (Nickel et al). Die Enthemmung erfolgt, weil das motorische α-Neuron nicht durch sein inhibitorisches Schaltneuron in der Aussendung von Aktionspotentialen gehindert wird (Nickel et al.). Für einige Tierarten (z.B. Katze) ist die präsynaptische inhibitorische Wirkungsweisen von Glycin auf die Motoneuronen bereits bewiesen (Semba and Kano). Dabei sind die Stoffwechseländerungen komplexer Natur. Es ergeben sich durch den Tetanustoxin-Einfluß zahlreiche Änderungen im Ionenfluß und Energiehaushalt (Watkins 1972). Takahao und Kano (1973) vermuten neben der motorischen Interferenz des Toxins auch einen Einfluß auf die γ-Motoneuronen.

Als Sonderform des lokalen Tetanus wird klinisch beim Menschen der Kopftetanus unterschieden. Dieser tritt dann auf, wenn die Eintrittspforte für C. tetani im Kopfbereich liegt und das Tetanus-Toxin entlang den motorischen Kopfnerven ascendiert (Weinstein). Der Transport des Toxins erfolgt dabei über den motorischen Teil des VII. Gehirnnerven (Fischer et al.).

Es ist schon lange bekannt, daß ein generalisierter Starrkrampf aus einem lokalen Tetanus entstehen kann. Nach Verteilung des Toxins im Körper wird es von verschiedenen Nervenendigungen in unterschiedliche Rückenmarkssegmente transportiert und bewirkt als multipler lokaler Tetanus spastische Paresen und Konvulsionen (Erdmann und Habermann 1977).

Viele Patienten haben neben diesen zentralen spastischen Erscheinungen auch Störungen des autonomen Nervensystems,

welche sich z.B. durch Schwitzen, Tachycardie, Herzarrhythmie und vermehrte Katecholaminausscheidung im Urin äußern (Kerr et al.).

Bigalke und Habermann untersuchten die Wirkung des Tetanus-Toxins auf den Mesenterial-Plexus des Darmes und konnten nachweisen, daß Tetanus-Toxin wie Botulismus A-Toxin auch eine paralytische Wirkung hat, wobei die Wirkung des Botulismus A-Toxins jedoch bis zu 500-mal stärker war. Eine paralytische Wirkung des Tetanus-Toxins wird auch an den neuromuskulären Synapsen beschrieben (Habermann et al. 1980).

Eigene Untersuchungen

1. Material und Methoden

1.1. Versuchstiere

Für die Untersuchung standen insgesamt 598 Pferde zur Verfügung. Dabei handelte es sich um 75 Traber, 466 Warmblutpferde und 57 Ponys beiderlei Geschlechts.

Das Alter der Versuchstiere lag zwischen 4 Wochen und 18 Jahren.
Vor Versuchsbeginn wurden von jedem Tier Alter und Zahl der vorausgegangenen Tetanus-Impfungen aufgenommen.

1.2. Impfstoff

Zur intranasalen Impfung verwendeten wir ein mit Formalin inaktiviertes Tetanus-Toxin der Firma Behringwerke AG Marburg. Das Toxoid war gereinigt und enthielt keine Adjuvantien. Die Dichte des Toxoid-Konzentrats betrug 2000 Lf pro ml.

Für eine Versuchsreihe wurden dem Tetanus-Toxoid 10 % Glycerin zur Stabilisierung und besseren Haftung an den Schleimhäuten des Respirationstraktes beigemengt.

Zur intramuskulären Impfung diente Tetanol der Firma Behringwerke AG.

1.3. Immunisierung

Die intranasale Impfung erfolgt auf verschiedene Weise:

a) Der Impfstoff wurde in einer Hauptner Muto-Spritze aufgezogen, auf die ein 6,5 cm langer Sprühadapter mit einer 0,3 mm großen Öffnung aufgeschraubt worden war. Wir führten den Sprühadapter zur Impfung in eine Nasenöffnung des Pferdes ein.

b) Der Impfstoff wurde über eine Nasensonde mit Sprühkopf, die etwa 30 cm in die Nase eingeführt wurde, in der hinteren Nasenhöhle versprüht.

c) Lyophilisiertes Tetanus-Toxoid wurde gleichmäßig pulverisiert und unter Druck mit Treibgas (Frigen) in eine Sprühdose mit Sprühkopf verbracht.

d) Lyophilisiertes Tetanus-Toxoid wurde gleichmäßig pulverisiert und mit CO_2 unter Druck in eine Sprühdose verbracht.

In beiden Fällen war die Toxoidmenge in der Sprühdose so berechnet, daß bei einem einmaligen, ca. eine halbe Sekunde dauernden Sprühvorgang 1000 Lf Tetanus-Toxoid appliziert wurden.

1.4. Impfdosis

Bei der nasalen Impfung wurden 500, 1.000 und 2.000 Lf einmal in einer Nasenhöhle vernebelt bzw. versprüht.

1.5. Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde vor und 10 bis 14 Tage nach der Impfung durchgeführt. Bei einem Teil der Versuchstiere entnahmen wir auch mehrmals nach der Impfung Blut.

1.6. Gewinnung der Sera

Das Blut wurde nach der Entnahme über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag bei ca. 3.000 UpM zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde bis zur Durchführung der Antitoxinbestimmung bei -20°C eingefroren.

1.7. Indirekte Hämagglutination

1.7.1. Behandlung der Sera

Die Pferdesera wurden bei 56°C im Wasserbad 30 Minuten inaktiviert und anschließend mit Hammelerythrozyten absorbiert. Hierfür wurden 0,1 ml Hammelerythrozyten zu je 1 ml Serum gegeben und nach etwa 1-stündiger Bebrütung des Gemisches wieder abzentrifugiert.

1.7.2. Antigen

Als Antigen verwendeten wir das gleiche Tetanustoxoid-Konzentrat wie zur Impfung.

1.7.3. Sensibilisierung der Hammelerythrozyten (HE)

Zur Sensibilisierung der HE mischten wir einen Teil einer 2,5 %-igen HE-Suspension mit zwei Teilen Tetanus-Toxoid 1.000 Lf pro ml und 1 Teil Glutaraldehyd (1 %-ig) und bebrüteten das Gemisch 2 Stunden bei 37°C. Anschließend wurden die Erythrozyten zweimal in 0,14M NaCl gewaschen und auf eine Konzentration von 0,5 % eingestellt.

1.7.4. Durchführung des Testes

Von den Pferdesera wurde in Agglutinationsröhrchen eine Verdünnungsreihe in 2-er Potenzen mit 0,3 ml Serum in Phosphatpuffer angelegt. Zu jeder Verdünnungsstufe wurden 0,3 ml sensibilisierte HE pipettiert. Als Kontrolle wurden ein Kaninchenimmunserum (positive Serumkontrolle) und ein Pferdenormalserum (negative Serumkontrolle) parallel zu den übrigen Sera getestet. Ferner wurden alle Sera mit nicht sensibilisierten HE (Serumkontrolle) und der verwendete Phosphatpuffer mit sensibilisierten HE (Pufferkontrolle) auf unspezifische Reaktionen überprüft. Nach 16-stündiger Bebrütung des Gemisches bei Zimmertemperatur erfolgte die Ablesung der Reaktion.

1.8. Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

1.8.1. Puffer

Für die Durchführung des ELISA wurden folgende Puffer verwendet:

NaCl-Phosphat-Puffer (NaCl-PP): 8 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4, 2,9 g $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$, 0,2 g KCl in 1000 ml Aqua dest. gelöst, pH7,4;

NaCl-Tween-Puffer: NaCl-PP + 0,5 % Tween 20;

Substratpuffer: 12,28 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 1,96 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ und 3,723 g EDTA (Na-Salz) in 1000 ml Aqua dest. gelöst;

Karbonat-Bikarbonat-Puffer: 1,59 g Na_2CO_3 und 2,93 g HCO_3 in 1000 ml Aqua dest. gelöst, pH 9,6

1.8.2. Beschichtung der Platten

Die Beschichtung der Platten (Immulon, Flachboden-Mikrotiterplatten der Fa. Flow) erfolgte mit dem zur Impfung verwendeten Tetanus-Toxoid Konzentrat (2000 Lf/ml, Behringwerke AG) in einer Verdünnung von 1:10.000 mit Karbonat-Bikarbonat Puffer. Pro Vertiefung wurden 100 µl dieser Gebrauchsverdünnung einpipettiert und die Platten anschließend drei Stunden bei 37°C und 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten dreimal mit Aqua dest. +0,05 % Tween 20 gründlich gewaschen.

1.8.3. Konjugat

Das Meerrettich-Peroxidase-anti Pferd IgG wurde von der Fa. Miles Yeda Ltd. bezogen. Nach Herstellerangaben lag die Peroxidase Aktivität (mit Pyrrogallolmethode) bei 580 Einheiten pro ml. Die Gebrauchsverdünnung, die in einem Schachbrettitrationsversuch ausgewertet wurde, lag bei

1:300 mit 5 %-igem foetalem Kälberserumzusatz (FKS). Die 5 %-ige FKS Zugabe sollte unspezifische Anlagerungen an den Polystyrolwänden verhindern.

1.8.4. Indikator

Als Indikator für das Enzym-Substrat-Indikator-Gemisch diente 5-Aminosalicylsäure (Merck), die in einer Konzentration von 1 mg/ml in einem 0,01 M Phosphatpuffer mit 1 mM EDTA, ph 6,0 (Substratpuffer) gelöst wurde. Erst unmittelbar vor der Verwendung erfolgte die Zugabe von H_2O_2 bis zu einer Endverdünnung von 0,005 %.

1.8.5. Durchführung des Testes

Von den zu untersuchenden Serumproben legten wir eine Verdünnungsreihe in 2-er Potenzen mit NaCl-Tween-Puffer an. Neben den zu untersuchenden Sera wurde auf jeder Platte ein positives und negatives Kontrollserum mitgeführt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C auf einem Schüttelgerät wurden die Platten viermal mit Aqua dest. + 0,05 % Tween 20 gewaschen. Danach wurden 100 µl des Konjugats (1:300) in jede Vertiefung pipettiert, die Platten eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttelgerät inkubiert und viermal mit Aqua dest. + 0,05 % Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des Enzym-Substrat-Indikator-Gemisches in jede Vertiefung pipettiert.

1.8.6. Ablesung

Nach einer Reaktionszeit von einer halben Stunde bei Zimmertemperatur, in der die Platten eine Viertelstunde gelegentlich geschüttelt und dann eine Viertelstunde stehengelassen wurden, erfolgte die Ablesung photometrisch mit einem Multiscangerät (Flow) direkt durch den Boden der Platten unter Verwendung eines 503 nm Filters.

1.9. Aktiver Mäuseschutzversuch

Am 18. Tag der Immunisierung wurden die Versuchstiere der Testbelastung unterzogen. Die Belastung erfolgte subkutan mit 10 LD_{50} Tetanus-Toxin. Der Verlauf der Belastungsversuche wurde über eine Dauer von 4 Tagen beobachtet. Der durch die Immunisierung erzielte Wirksamkeitsindex (WI) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$WI = \frac{a - b}{a} \cdot 100$$

a = Zahl der belasteten Tiere

b = Zahl der nach der Belastung gestorbenen Tiere

2. Ergebnisse

2.1. Vergleich der Empfindlichkeit zwischen indirekter Hämagglutination und ELISA für die Tetanus-Antitoxinbestimmung.

In den letzten Jahren haben sich zwei Methoden zur Antitoxinbestimmung in den Vordergrund geschoben, die indirekte Hämagglutination und der ELISA. Beide Methoden haben den Vorteil, daß sie schnell und einfach durchführbar sind und gut reproduzierbare Ergebnisse liefern. Die Entscheidung für eine der beiden Methoden wollten wir in unseren Untersuchungen von der Empfindlichkeit abhängig machen. Wir haben deshalb in Vorversuchen eine Anzahl ausgewählter Sera vergleichend mit der indirekten Hämagglutination und dem ELISA auf Tetanus-Antitoxine untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Bei der Auswertung der Sera erschien es sinnvoll, zwei Gruppen zu bilden, nämlich eine Gruppe in der die Ergebnisse der Sera mit niedrigen bzw. negativen Antitoxintitern (Erstimpflinge), und eine Gruppe in der die Ergebnisse der Sera mit hohen Antitoxintitern (Wiederholungsimpflinge) zusammengefaßt wurden. Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, war die Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination und des ELISA in beiden Gruppen unterschiedlich. In der Versuchsgruppe I ließen sich mit der indirekten Hämagglutination sowohl vor als auch nach der Impfung keine Tetanus-Antitoxine nachweisen. Mit dem ELISA konnten wir zwar vor der Impfung keine Antitoxine, dagegen in allen 20 geprüften Sera spezifische Tetanus-Antitoxine nach der Impfung nachweisen. Der mittlere Antitoxintiter betrug 1:18. In der Versuchsgruppe II (Wiederholungsimpflinge), in der wir Sera mit höheren Ausgangstitern zusam-

mengefaßt hatten, war das Ergebnis dagegen umgekehrt, d.h. die indirekte Hämagglutination war empfindlicher als der ELISA. So stieg der mittlere Hämagglutinationstiter von 1:200 vor der Impfung auf 1:840 nach der Imfpung an; der ELISA-Titer dagegen nur von 1:23 auf 1:110. Der Anstieg lag aber bei beiden Verfahren in etwa der gleichen Größenordnung (etwas über das 4-fache) nur auf einem anderen Titerniveau.

Auf Grund dieser Ergebnisse wählten wir in unseren Untersuchungen für die Bestimmung der Tetanus-Antitoxine bei Erstimpflingen den ELISA und bei Wiederholungsimpflingen die indirekte Hämagglutination.

2.2. Unschädlichkeitsuntersuchungen

Im Rahmen dieser Untersuchungen impften wir insgesamt 540 Pferde intranasal gegen Tetanus. Bei keinem vakzinierten Pferde wurden Störungen des Allgemeinbefindens beobachtet. Die intranasal geimpften Pferde hatten, obwohl sie oftmals direkt im Anschluß an die Impfung intensiv gearbeitet wurden, keinen Leistungsabfall zu verzeichnen.

Bei drei intranasal geimpften Pferden trat kurz nach der Impfung Nasenbluten auf. In allen drei Fällen kam die Blutung wenige Minuten nach Hemoscon^{R} (Vemie) Behandlung zum Stillstand. Da es bei diesen Pferden zu Abwehrbewegungen bei der Impfung kam, ist nicht auszuschließen, daß in diesen Fällen mit dem Sprühadapter die Nasenschleimhaut verletzt wurde. Diese drei Fälle ereigneten sich bei Ponys des gleichen Bestandes (mit Inzuchttieren), so daß auch eine genetische Disposition zu Epistaxis nicht ausgeschlossen werden kann.

2.3. Wirksamkeitsuntersuchungen

Im Gegensatz zur parenteralen Impfung besitzt bei der lokalen Impfung die Applikationstechnik eine entscheidende Bedeutung für die Wirksamkeit. In unseren Impfversuchen beim Pferd haben wir folgende Applikationsmethoden für die intranasale Impfung erprobt:

a) die Impfung mit einer Nasensonde mit Sprühkopf,
b) die Impfung mit einer Spritze mit aufgesetztem Sprühadapter,
c) die Impfung mit Sprays, die entweder CO_2 oder Frigen als Treibmittel besaßen (vgl. Material und Methoden).

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich wird, erzielten wir nur mit den beiden ersten Applikationsmethoden eine Immunitätsstimulierung. Die intranasale Impfung mit den Impfsprays war praktisch wirkungslos. Die intranasale Applikation des Toxoids mit der Nasensonde, die bis zum Kehlkopf eingeführt wurde, brachte das beste Ergebnis. Bei den mit der Nasensonde geimpften Tieren verzeichneten wir im Durchschnitt einen Antitoxintiteranstieg um das 3,8-fache (von 1:360 auf 1:1.380). Die intranasale Impfung mit der Spritze mit aufgesetztem Sprühadapter war nicht ganz so effektiv. Die Antitoxintiter stiegen um das 2,4-fache von 1:240 auf 1:570 an. Trotz der etwas geringeren Wirksamkeit muß man von der impftechnischen Seite her gesehen der Impfung mit dem Sprühadapter den Vorzug geben, da die Einführung einer Nasensonde zum Zwecke der Impfung zu aufwendig und schwierig ist, um in der Praxis auf breiter Basis angewendet werden zu können.

Nach intranasaler Impfung mit den beiden Impfsprays (Tetanus-Toxoid und CO_2 bzw. Frigen) erreichten wir beim Pferd keine signifikanten Antitoxintiteranstiege. Im Falle

des "Frigensprays" lag der mittlere Antitoxintiter vor und 14 Tage nach der Impfung bei 1:512. Beim "CO_2-Spray" stieg der mittlere Antitoxintiter nur von 1:64 vor der Impfung auf 1:72,14 Tage nach der Impfung.

Als Ursache für das Versagen der Impfsprays kommt entweder eine Zerstörung der immunisierenden Eigenschaften des Tetanus-Toxoids durch das Frigen bzw. CO_2, oder aber eine ungenügende Verteilung, Dosierung oder Anhaftung des Toxoids an der Nasenschleimhaut in Frage. Um zu prüfen, ob das Toxoid in der Spraydose zerstört wurde, entnahmen wir das in Frigen bzw. CO_2 gelöste Toxoid und injizierten es Mäusen, nach Reinigung von dem Treibmittel, in einer Dosis von ca. 100 Lf subkutan. Zum Vergleich wurden andere Mäuse subkutan mit 2 Lf frischem Tetanus-Toxoid geimpft. Einen Überblick über die Wirksamkeit der verschiedenen Toxoide im aktiven Mäuseschutzversuch vermittelt Tabelle 3.

Obwohl die Impfdosis bei den Toxoiden aus der Spraydose das 50-fache des frischen Toxoids betrug, lag der Wirksamkeitsindex bei den damit geimpften Mäusen nur bei 15 (CO_2) bzw. bei 0 (Frigen). Die zum Vergleich mit 2 Lf frischem Tetanus Toxoid geimpften Mäuse waren dagegen vollkommen (WI = 100) gegen den Toxinchallenge mit 10 LD_{50} Tetanus-Toxin geschützt. Auf Grund dieser Ergebnisse können wir mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Wirkungslosigkeit der Impfsprays auf einer teilweisen bzw. vollständigen Zerstörung des Toxoids durch das Treibmittel beruht.

Bei einer weiteren Gruppe von Pferden prüften wir, ob sich das Ergebnis der intranasalen Impfung mit der Nasensonde verbessern läßt, wenn dem Tetanus-Toxoid Glycerin zugesetzt wird. Durch das Glycerin erhofften wir uns eine bessere Haftung des Toxoids an den Schleimhäuten und damit eine höhere Resorptionsrate. Diese Hoffnungen erfüllten

sich aber nicht. Der Glycerinzusatz (10 %) zum Tetanus-Toxoid brachte keine Steigerung des intranasalen Immunisierungsergebnisses, im Gegenteil; das Ergebnis war schlechter als das nach Impfung mit dem Toxoid ohne Zusatz (vgl. Tab. 4). Bei der Pferdegruppe, die mit Tetanus-Toxoid und Glycerin intranasal geimpft wurde, stieg der mittlere Antitoxintiter von 1:36 auf 1:64. Die mit dem reinen Toxoid geimpften Pferde hatten dagegen eine Titererhöhung von 1:64 (vor der Impfung) auf 1:1.024 (14 Tage nach der Impfung).

Als praktikabelste und wirksamste Impfmethode erwies sich in den bisherigen Untersuchungen die intranasale Impfung mit Spritze mit aufgesetztem Sprühadapter und die Verwendung von reinem Toxoid ohne Zusatz. Die weiteren Versuche hatten das Ziel, die Impfdosis für diese intranasale Applikationsmethode so abzustimmen, daß das Ergebnis dem nach intramuskulären Impfungen mit handelsüblichen Tetanus-Impfstoffen entspricht. Einen Überblick über die Ergebnisse dieser Untersuchungen gibt Tabelle 5.

Mit einer Impfdosis von 500 Lf erzielten wir einen Titeranstieg um das 1,3-fache, nämlich von 1:190 auf 1:240, wobei von den 50, mit dieser Dosis geimpften Pferden nur 37 % mit einem Antitoxintiteranstieg reagierten. Bei der Verdoppelung der intranasalen Dosis auf 1.000 Lf Toxoid stiegen die mittleren Antitoxintiter wesentlich stärker von 1:240 auf 1:570 an. Dies entspricht einem Anstieg um das 2,4-fache. Von den 250 mit 1.000 Lf geimpften Pferden reagierten 59 % mit einem Antitoxintiteranstieg. Eine weitere Verdoppelung der intranasalen Impfdosis auf 2.000 Lf brachte keine weitere Verbesserung des Impfergebnisses. Der Titeranstieg lag, wie bei dem mit 1.000 Lf geimpften Pferden in der Größenordnung von 2,4. Bei 50 % der mit 2.000 Lf geimpften Pferden stieg der Antitoxintiter an. Auf Grund dieser

Ergebnisse kann man eine Toxoiddosis von 1.000 Lf als günstigste Impfdosis für die intranasale Applikation mit einer Spritze mit aufgesetztem Sprühadapter ansehen.

Wichtig für die Beurteilung der Wirksamkeit dieses optimalen nasalen Impfverfahrens war die Vergleichbarkeit der Immunisierungsergebnisse mit der herkömmlichen intramuskulären Impfung mit einem zugelassenen Tetanus-Impfstoff. Wie aus der Tabelle 5 ersichtlich wird, war das Ergebnis der intramuskulären Impfung kaum verschieden von dem nach intranasaler Impfung mit 1.000 Lf Tetanus-Toxoid. Nach intramuskulärer Vakzination stieg der mittlere Antitoxintiter von 1:400 vor der Impfung um das 2,3-fache auf 1:930 14 Tage nach der Impfung. Von den intramuskulär geimpften Pferden reagierten dabei 65 % mit einem Antitoxintiteranstieg.

Bei keinem einzigen der mit der Placebovakzine (physiologische NaCI) geimpften Tiere, stellten wir einen Titeranstieg fest.

In den bisherigen Untersuchungen maßen wir den Antitoxingehalt 14 Tage nach intranasaler Impfung. Bei einem Teil der Versuchspferde haben wir aber 10 und 60 Tage post vaccinationem (p. vacc.) Blut zur Antitoxinbestimmung entnommen. Die Ergebnisse der Antitoxinbestimmung bei den verschiedenen Gruppen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Antitoxintiter vom 10. bis 60. Tag gleichmäßig anstiegen. 10 Tage p. vacc. betrug der Anstieg das 2-fache (von 1:450 auf 1:910), 14 Tage p. vacc. das 2,6-fache (von 1:230 auf 1:610) und 60 Tage p. vacc. das 3,4-fache (von 1:78 auf 1:260). Die Zahl der Tiere mit

Titeranstieg zeigten dagegen keinen Aufwärtstrend. Am wenigsten Tiere reagierten 10 Tage p. vacc. mit einem Titeranstieg (40 %), während wir bei den meisten (64 %) einen Titeranstieg 14 Tage p. vacc. feststellten. Zwischen diesen beiden Werten lag das Ergebnis 60 Tage p. vacc. (53,5 %).

Diese Ergebnisse können aber nur als Anhaltspunkte gelten, da die Blutentnahmen nicht an gleichem Tiermaterial, sondern an unterschiedlichen Gruppen gewonnen wurden. Bemerkenswert ist aber in jedem Fall das Ansteigen der Antitoxintiter zwischen dem 10. und 60. Tag p. vacc., das auf Grund seiner Gleichmäßigkeit durchaus als Trend gewertet werden kann.

In unsere Impfversuche wurden unterschiedliche Pferderassen einbezogen. Dadurch bot sich die Gelegenheit, die Immunreaktion der einzelnen Pferderassen auf die intranasale Impfung einander gegenüberzustellen. Einen Überblick über das Ergebnis bei Trabern, Warmblutpferden und Ponys vermittelt Tabelle 7.

Wenn man zunächst den prozentualen Anteil der Tiere mit Titeranstieg bei den einzelnen Pferderassen ansieht, so ergeben sich doch relativ deutliche Unterschiede. Bei den Trabern errechneten wir einen Anteil der Reagenten von 75 %. Dieser Wert liegt um 10 % über dem der Ponys und um 24 % über dem der Warmblutpferde. Die Ursache hierfür könnte rassebedingt sein. Es fällt aber auf, daß bei den Warmblutpferden die Gruppe ohne Titeranstieg den höchsten mittleren Antitoxintiter von allen drei Rassen besitzt Es ist deshalb wahrscheinlich, daß sich bei Pferden mit sehr hohem Ausgangstiter sehr viel schwerer durch die Tetanus-Impfung ein weiterer Antitoxintiteranstieg stimulieren läßt, als bei Pferden mit niedrigerem Ausgangstiter. In der Gruppe der Reagenten ergaben sich dagegen keine

wesentlichen Unterschiede bezüglich des Antitoxintiteranstieges bei den einzelnen Rassen. Die Anstiege unterschieden sich nur unwesentlich voneinander. Bei den Ponys stiegen sie um das 1,8-fache, bei den Trabern um das 2-fache und bei den Warmblutpferden um das 2,25-fache an.

Bei allen bisher besprochenen Impfungen handelt es sich um Revakzinationen und um Ergebnisse der indirekten Hämagglutination. Ein Teil der Impfungen wurde aber auch bei Erstimpflingen durchgeführt. Da wir von vorneherein bei diesen Impfgruppen und zwar sowohl nach intramuskulärer als auch nach intranasaler Impfung mit sehr geringen Antitoxintitern rechneten, verwendeten wir hier den ELISA für die Antitoxinbestimmung. Einen Überblick über die Ergebnisse der intranasalen Impfung bei Erstimpflingen gibt Tabelle 8.

Die Fohlen wurden in einem Alter von 6 Wochen das erstemal immunisiert. Zu diesem Zeitpunkt konnten wir nur geringe Spuren von Antitoxinen im Serum feststellen (mittlerer Titer 1:2), die wahrscheinlich maternalen Ursprungs waren. Nach intranasaler Impfung blieb der Titer zunächst 2 Wochen lang unverändert und stieg dann bis zur 10. Lebenswoche (4 Wochen p. vacc.) auf 1:12 an. Die immunologische Reaktion auf die Erstimpfung war also im Vergleich zur Boosterimpfung relativ schwach. Der mittlere Titer von 1:12 in der 10. Lebenswoche fiel anschließend bis zur 17. Lebenswoche (11 Wochen p. vacc.) auf 1:8 ab. In der 17. Woche impften wir die Fohlen zum zweitenmal intranasal mit 1.000 Lf. Nach dieser Impfung beobachteten wir eine geringe Boosterreaktion. Die Antitoxintiter stiegen im Durchschnitt auf 1:32 an, also etwas über das Titerniveau nach der ersten Impfung. Der Antitoxintiter von 1:32 persistierte nur sehr kurz. In der 32. Lebenswoche waren die mittleren Antitoxintiter bereits wieder auf 1:8 abge-

fallen. Die Fohlen wurden zu diesem Zeitpunkt zum drittenmal mit 1.000 Lf Tetanus Toxoid geimpft. Drei Wochen später lagen die mittleren Antitoxintiter (1:36) nur unwesentlich höher, als nach der Zweitimpfung und nach 20 Wochen fiel der Titer praktisch auf den Ausgangswert zurück. Der mittlere Antitoxintiter bei 57 Wochen alten Fohlen lag also, obwohl wir diese Tiere zwischenzeitlich dreimal intranasal geimpft hatten, bei 1:2.

Die zweimalige intramuskuläre Impfung von Fohlen brachte aber auch keine wesentlich höheren Antitoxintiteranstiege (Tabelle 9). Die Antitoxintiter lagen vor der Impfung (4. Lebenswoche) bei 1:2. 10 Wochen nach der intramuskulären Erstimpfung verzeichneten wir einen Anstieg auf 1:6. Dieser Titer konnte auch durch die in der 14. Lebenswoche vorgenommene Zweitimpfung kaum geboostert werden, denn wir maßen sechs Wochen nach der Zweitimpfung nur einen mittleren Antitoxintiter von 1:12.

Tab. 1 : Ergebnis der Tetanus-Antitoxinbestimmung mit der indirekten Hämagglutination Im Vergleich zum ELISA.

Versuchsgruppe	n	mittlerer Antitoxintiter[1]			
		indirekte Hämmagglutination		ELISA	
		vor der Impfung	nach der Impfung[2]	vor der Impfung	nach der Impfung[2]
I (Erstimpflinge)	10	neg.	neg.	neg.	1:18
II (Wiederimpflinge)	10	1:200	1:840	1:23	1:110

[1] geometrischer Mittelwert

[2] 30 Tage p. vacc.

Tab. 2 : Ergebnis der intranasalen Impfung bei unterschiedlicher Applikation des Tetanus Toxoids.

Applikationstechnik		Impf-dosis	n	mittlerer Antitoxintiter[1]		Anstieg
				vor der Impfung	nach der Impfung[2]	
Nasensonde mit Sprühkopf		1:000 Lf	50	1:360	1:1.380	3,8 fach
Spritze mit Sprühadapter		1.000 Lf	250	1:240	1: 570	2,4 fach
Spray	mit CO_2	1.000 Lf	30	1: 64	1: 72	-
	mit Frigen	1.000 Lf	30	1:512	1: 512	-

1) geometrischer Mittelwert

2) 14 Tage p. vacc.

Tab. 3 : Immunogenität eines in Frigen oder CO_2 gelösten Tetanus Toxoids im aktiven Mäuseschutzversuch.

Impfstoff[1)]	Impfdosis	n	Wirksamkeitsindex[2)]
Tetanus-Toxid + Frigen	ca 100 Lf	30	0
Tetanus-Toxoid + CO_2	ca 100 Lf	30	15
Tetanus-Toxoid	2 Lf	30	100

[1)] subkutane Applikation

[2)] Toxinchallenge mit 10 LD_{50} Tetanus-Toxin

Tab. 4 : Wirksamkeit eines Tetanus-Impfstoffes mit und ohne Glycerin-Zusatz bei intranasaler Applikation an Pferden.

Impfstoff	Applikations-form	Impfdosis	n	mittlerer Antitoxintiter[1)]	
				vor der Impfung	nach der Impfung
Tetanus-Toxoid + 10 % Glycerin	Nasensonde	1.000 Lf	10	1:36	1: 64
Tetanus-Toxoid	Nasensonde	1.000 Lf	10	1:64	1:1.024

[1)] geometrischer Mittelwert

Tab. 5 : Ergebnis der intranasalen Revakzination (Sprühadapter) gegen Tetanus bei unterschiedlicher Dosierung im Vergleich zur intramuskulären Impfung.

Applikationsart	Impf-dosis	n	mittlerer Antitoxintiter[1]		Anzahl der Tiere mit Titeranstieg	Anstieg
			vor der Impfung	nach der Impfung[2]		
intranasal	500 Lf	50	1:190	1:240	37 %	1,3 fach
	1.000 Lf	250	1:240	1:570	59 %	2,4 fach
	2.000 Lf	50	1:54	1:130	50 %	2,4 fach
intramuskulär (Tetanol)	ca 30 Lf (150 I.E.)	38	1:400	1:930	65 %	2,3 fach
Placebo (phys. NaCl)	-	50	1:340	1:340	0	0

[1] geometrischer Mittelwert

[2] 14 Tage p. vacc.

Tab. 6 : Mittlere Antitoxintiter nach intranasaler Impfung[1] gegen Tetanus zu verschiedenen Zeiten p. vacc.

Zeitpunkt der Entnahme	n	mittlerer Antitoxintiter[2]		Zahl der Tiere mit Titeranstieg	Anstieg
		vor der Impfung	nach der Impfung		
10 Tage p. vacc.	45	1:450	1:910	40 %	2-fach
14 Tage p. vacc.	199	1:230	1:610	64 %	2,6-fach
60 Tage p. vacc.	60	1:78	1:260	53,6 %	3,4-fach

[1] 1.000 Lf, Sprühadapter

[2] geometrischer Mittelwert

Tab. 7 : Ergebnis der intranasalen Impfung (Spritze mit Sprühadapter, 1.000 Lf) gegen Tetanus bei unterschiedlichen Pferderassen.

Pferderasse	n	Zahl der Pferde mit Titeranstieg (in %)	mittlerer Antitoxintiter[1]			
			Gruppe ohne Titeranstieg		Gruppe mit Titeranstieg	
			vor der Impfung	nach der Imfung[2]	vor der Impfung	nach der Impfung[2]
Traber	52	75	1:423	1:423	1:363	1:1.485
Warmblut	146	51	1:591	1:591	1:149	1: 751
Pony	57	65	1:385	1:385	1:124	1: 424

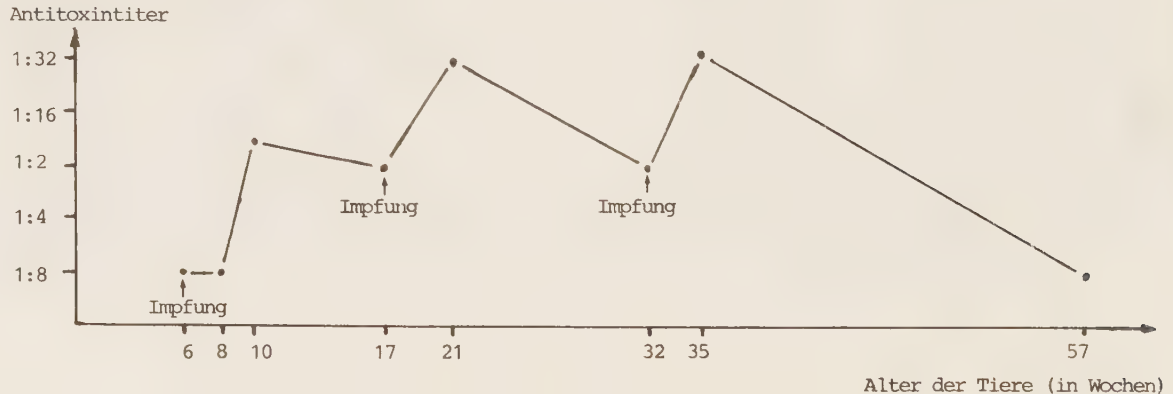
[1] geometrischer Mittelwert

[2] 14 Tage p. vacc.

Tabelle 8 : Ergebnis der intranasalen Tetanus-Impfung (Sprühadapter) bei Erstimpflingen (Fohlen).

	Alter der Impflinge (n = 20)									
	6 Wochen	8 Wochen	10 Wochen	17 Wochen	21 Wochen	32 Wochen	35 Wochen	57 Wochen
mittlere Antitoxin-titer (ELISA)	1:2	1:2	1:12	1:8	1:32	1:8	1:36	1:2

↑ Impfung (1.000 Lf) ↑ Impfung (1.000 Lf) ↑ Impfung (1.000 Lf)



Tab. 9 : Ergebnis der intramuskulären Tetanus-Impfung bei Erstimpflingen (Fohlen).

	Alter der Impflinge (n = 20)				
	4 Wochen		14 Wochen		20 Wochen
mittlerer Antitoxin-titer (ELISA)	1:2		1:6		1:12
		↑ Impfung (Tetanol)		↑ Impfung (Tetanol)	

Besprechung der Ergebnisse

Der Beweis, daß gegen Tetanus auch auf intranasalem Wege immunisiert werden kann, wurde in früheren Untersuchungen bereits erbracht (E. Baljer, G. Baljer et al.,G. Baljer, Berger, Cronau, Mayr et al.). In der vorliegenden Studie sollten beim Pferd Bedingungen für den Einsatz der intranasalen Tetanus-Impfung in der Praxis erarbeitet werden. Als Bemessungsgrundlage für die Tauglichkeit des intranasalen Impfverfahrens galten Unschädlichkeit, Praktikabilität und Wirksamkeit.

Die erste Frage beim Einsatz eines neuen Impfverfahrens konzentriert sich zunächst auf die Unschädlichkeit. In unseren Untersuchungen wurden 540 Pferde unter Praxisbedingungen intranasal gegen Tetanus geimpft. Dabei wurden keine Impfreaktionen, die zu Lasten des Impfstoffes gingen, beobachtet. Griffith beschrieb dagegen nach intramuskulärer Impfung bei etwa 2 % der Impflinge lokale Impfreaktionen, die wahrscheinlich auf das Adjuvans zurückzuführen waren. Das nach intranasaler Impfung bei etwa 0,5 % der Pferde aufgetretene Nasenbluten, war durch eine Verletzung der Nasenschleimhaut mit dem starren Sprühadapter nach überraschenden Abwehrbewegungen der Impflinge verursacht worden. Das Nasenbluten sistierte unmittelbar nach hämostyptischer Behandlung. Durch Verwendung eines weichelastischen Sprühadapters, lassen sich diese Nebenwirkungen mit Sicherheit vermeiden. Wichtig ist die Tatsache, daß bei den Tieren mit Nasenbluten die Immunreaktion nicht beeinträchtigt war. Bei allen übrigen Impflingen erwies sich die intranasale Impfung als absolut unschädlich.

Von den verschiedenen intranasalen Applikationstechniken erwies sich das Versprühen von Tetanus-Toxoid im hinteren Nasenraum mittels der Nasensonde als wirksamste Methode.

Mit der 30-fachen intramuskulären Impfdosis erreichten wir ein Immunisierungsergebnis, welches das nach intramuskulärer Impfung sogar übertraf. Dieses Verfahren war jedoch, von der Impftechnik her gesehen, viel zu aufwendig, um in der Praxis verwendet werden zu können.

Die intranasale Impfung mit Spritze und aufgesetztem Sprühadapter, bei der das Toxoid im vorderen Nasenraum versprüht wurde, erfüllte dagegen sowohl in bezug auf die Praktikabilität als auch die Wirksamkeit alle Anforderungen. Bei 30-fach höherer intranasaler Dosierung als bei der intramuskulären Impfung entsprach das intranasale Immunisierungsergebnis dem nach intramuskulärer Impfung. Die intranasale Impfung mit dem Sprühadapter ist sehr einfach durchzuführen. Mit derselben Methode werden schon seit längerer Zeit Paramunisierungen und Parainfluenza-Impfungen in der Praxis bei Rindern durchgeführt. Auch in der Humanmedizin findet die mechanische intranasale Versprühung von Medikamenten gegen Schnupfen und Asthma breite Anwendung.

Die intranasale Applikation mit sogenannten Impfsprays mit Treibmittel haben gezeigt, daß dies ohne Zweifel die praktikabelste intranasale Impfung für die Praxis wäre. Das in den Spraydosen enthaltenen CO_2 bzw. Frigen zerstörte jedoch die antigenen Eigenschaft des Tetanus-Toxoids, so daß die intranasale Impfung mit den Impfsprays wirkungslos blieb. Durch die Verwendung anderer Treibmittel oder durch Stabilisierung des Tetanus-Toxoids gelingt es vielleicht in der Zukunft einen wirksamen Impfspray herzustellen. Von der Verwendung eines Impfspray erwarten wir eine Senkung der nasalen Impfdosis, da das Toxoid durch das Spray feiner zerstäubt, und tiefer in die oberen Luftwege eindringt. So bekommt das Toxoid einen größeren Oberflächenkontakt mit der Schleimhaut und kann die Immu-

nität in einem höheren Maße stimulieren. Die etwas höheren Herstellungskosten eines Sprays im Vergleich zur Impfung mit dem Sprühadapter würden sicherlich durch die notwendige niedrigere Impfdosis aufgewogen.

Es fiel in unseren Versuchen auf, daß die Titeranstiege der ersten experimentellen Versuche bei Pferd, Mensch und Hund nicht erreicht wurden (Cronau, E. Baljer, Berger). Dies betraf aber sowohl die intranasale als auch die intramuskuläre Impfung. In den ersten experimentellen Untersuchungen wurden bei der intranasalen Boosterimpfung (1.000 Lf) Titeranstiege zwischen 14- (Cronau) und 40-fach (E. Baljer) und bei der intramuskulären Impfung zwischen 7- beim Pferd (Cronau) und 26-fach beim Hund (Berger) erreicht.

Bei den vorliegenden Untersuchungen lagen dagegen die Titeranstiege nur im Bereich 2,5-fach und zwar sowohl bei der intramuskulären als auch bei der intranasalen Impfung.

Die Ursache für diese erheblichen Unterschiede ist sicher in der unterschiedlichen Probandenzahl begründet, da in den früheren Versuchsreihen dieselben Impfstoffe und auch dieselben Nachweismethoden verwendet wurden. Die Ergebnisse der ersten Untersuchungen wurden nur anhand einer ausgewählten, relativ kleinen Anzahl von Impflingen gewonnen.

Im Falle der Boosterimpfung kann man der intranasalen Impfung nach unseren vorliegenden Ergebnissen uneingeschränkt die Praxisreife bescheinigen. Das Ergebnis entsprach sowohl was die Zahl der Reagenten anbetraf, als auch in Bezug auf den postvakzinalen Antitoxintiteranstieg, dem der intramuskulären Impfung.

Etwas kritischer beurteilt werden muß noch die intranasale Primärimpfung bei Fohlen. Selbst nach dreimaliger intrana-

saler Impfung im ersten Lebensjahr stiegen die Antitoxintiter nur unwesentlich an und fielen nach kurzer Zeit wieder auf das Ausgangsniveau ab. Dies ist überraschend, weil sich ältere Pferde mit niedrigen Ausgangstitern oder sogar serologisch negative Pferde, bei denen die letzte Impfung gegen Tetanus mehrere Jahre zurücklag, sehr gut boostern ließen und in der Regel Antitoxintiter über 1:100 erreichten. Auch nach intranasaler Erstimpfung bei erwachsenen Hunden kam es zu ausgeprägten Titeranstiegen bis zu 1:64 (Berger). Die Ursache für dieses widersprüchliche Ergebnis muß in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.
Bei den Fohlen stiegen die Antitoxintiter nach der dritten Impfung im Durchschnitt nur auf 1:36 an. Da aber auch nach zweimaliger intramuskulärer Grundimmunisierung bei Fohlen die Antitoxintiter nur sehr wenig und zwar auf ca. 1:12 anstiegen, muß angenommen werden, daß Fohlen auf die Tetanus-Impfung sehr viel schwächer reagieren als erwachsene Pferde.

Die von uns verwendete indirekte Hämagglutination und der ELISA eigneten sich beide zum Nachweis von Tetanus-Antitoxinen. Überraschend war nur das Ergebnis bezüglich der Empfindlichkeit der beiden Testmethoden. Aufgrund der Untersuchungen von Fey und Stiffler-Rosenberg erwarteten wir, daß der ELISA in jedem Fall empfindlicher ist als die indirekte Hämagglutination. Nach Boosterimpfungen konnten wir aber wie Vos et al. in allen Fällen mit der indirekten Hämagglutination höhere Antitoxintiter nachweisen als mit dem ELISA. Dies ist überraschend, denn bisher wurde angenommen, daß mit der indirekten Hämagglutination vor allem Ig-M-Antikörper erfaßt werden. Die Boosterreaktion nach Tetanus-Impfung beruht aber vor allem auf der Bildung von Ig-G-Antikörpern (Vos et al.).

Zusammenfassung

Unter Praxisbedingungen wurden insgesamt 540 Pferde intranasal gegen Tetanus immunisiert. Davon waren 500 Wiederimpflinge und 40 Erstimpflinge. Der Wirksamkeitsnachweis erfolgte durch die Bestimmung der Serumantitoxintiter vor und nach der Impfung mit der indirekten Hämagglutination und dem ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay).

Bei 3 von 540 Pferden (0,5 %) kam es im Anschluß an die Impfung zu kurzzeitigem Nasenbluten durch Verletzung der Nasenschleimhaut mit dem Impfadapter. In allen anderen Fällen war die intranasale Impfung absolut unschädlich. Es wurden keine Lokal- oder Allgemeinreaktionen post vaccinationem beobachtet.

Als optimale nasale Impfmethode erwies sich die Verwendung einer Spritze mit aufgesetztem Sprühadapter. Impfsprays auf der Basis von CO_2 oder Frigen als Treibmittel waren wirkungslos.

Um ein der intramuskulären Impfung gleichwertiges Immunisierungsergebnis zu erreichen, muß bei Verwendung des Sprühadapters intranasal mit 1.000 Lf Tetanus-Toxoid geimpft werden. Bei der intranasalen Boosterimpfung erreichten wir einen Serumantitoxintiteranstieg um das 2,4-fache, von 1:240 auf 1:570 (indirekte Hämagglutination). Von insgesamt 250 mit 1.000 Lf geimpften Pferden reagierten 59 % mit einem Antitoxintiteranstieg. Nach der vergleichsweise durchgeführten intramuskulären Impfung stiegen die Antitoxintiter im Durchschnitt von 1:400 um das 2,3-fache auf 1:930. Der Prozentsatz der Reagenten lag bei 65 %.

Die Erstimpfung bei Fohlen (bis zum ersten Lebensjahr) brachte sowohl bei der intranasalen als auch bei der in-

tramuskulären Impfung nur geringe Antitoxintiteranstiege. Die höchsten durchschnittlichen Titer, die erreicht wurden, lagen nach dreimaliger intranasaler Impfung bei 1:36 und nach zweimaliger intramuskulärer Impfung bei 1:12 (ELISA).

Sowohl die indirekte Hämagglutination als auch der ELISA eignen sich zum Nachweis von Tetanus-Antitoxinen. Bei Erstimpflingen (Seren mit niedrigen Titern) war der ELISA, bei Revakzinationen (Seren mit höheren Titern) die indirekte Hämagglutination empfindlicher.

Summary

540 horses were immunized against tetanus by intranasal vaccination under field conditions. 40 of 540 were immunized for the first time whereas the other 500 had already been vaccinated previously. Serum antitoxin titers befor and after vaccination were determined by indirect hemagglutination and Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), as a measure of effectiveness.

Nose bleeding was observed by 3 of 540 horses (0,5 %) for a short time after vaccination. This was due to injury of the nasal mucous membrane by vaccination equipment. Intranasal vaccination proved to be absolutely harmless in all other cases. No signs of local or general irritation due to vaccination could be found.

The best method for intranasal vaccination proved to be the use of a syringe capped by a spray adapter. Vaccinating sprays which worked with CO_2 or Frigen^R as a propellent were inefficient.

1.000 Lf tetanus toxoid must be used for intranasal vaccination with a spray adapter in order to reach the same level of immunization obtained by intramuscular vaccination. Intranasal booster vaccination caused a 2.4 time rise of serum antitoxin titer from 1:240 to 1:570 (determined by indirect hemagglutination assay). 59 % of 250 horses that had been intranasally vaccinated with 1.000 Lf tetanus toxoid in the above mentioned manner showed an elevation in antitoxin titer. In comparison: after intramuscular vaccination the antitoxin titer rose on the average 2.3 times from 1:400 to 1:930. The percentage rate of the horses which showed an elevation in the level of serum antitoxin amounted to 65 %.

Only very small rises in antitoxin level could be reached both by intramuscular and intranasal primary vaccination of foals (up to one year of age). The highest average antitoxin titer obtained by intranasal vaccination was 1:36 after 3 subsequent vaccinations and 1:12 after 2 intramuscular vaccinations (determined by ELISA).

Both indirect hemagglutination and ELISA can be used for detecting tetanus antitoxin. ELISA is more sensitive when sera with a low antitoxin level are to be assayed (first time vaccinations) whereas indirect hemagglutination is more sensitive when working with relatively high levels of antitoxin (revaccinations).

Literaturverzeichnis

Baljer, E.: Orale und nasale Immunisierung gegen Tetanus beim Menschen.
Med. Diss., München (1978)

Baljer, G.: Oral immunisation against tetanus.
Develop. biol. Standard Vol. 33, 63 (1976)

Baljer, G., J. Sailer und A. Mayr: Vergleichende Untersuchungen über eine lokale Immunisierung gegen C. tetani und C. novyi.
Wehrmed. Mschr. 2: 48 (1978)

Baljer, G., H. Starflinger, K.-H. Sorg, J. Sailer und A. Mayr: Experimentelle Untersuchungen zur oralen Immunisierung mit Tetanus-Toxoid.
Zbl. Bakt. Hyg. I Orig. A 232: 488 (1975)

Basova, -: Detection of tetanus antitoxin in some species of freeliving rodents.
Zh. Mikr. Epid. i. Immunobiolog. 2, 144-145 (1972)

Berger, W.: Lokale Immunisierung gegen Tetanus beim Hund.
Vet. med. Diss., München (1979)

Bigalke, H., W. Dimpfel und E. Habermann: Suppression of ^{3}H-acetylcholine release from primary nerve cell cultures by tetanus and botulinum-A.toxin.
Nauvyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303, 133-138 (1978)

Bigalke, H. und E. Habermann: Blockade by Tetanus and Botulinum A Toxin of Postganglionic Cholinergic Nerve Endings in the Mysenteric Plexus.
Nauvyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 312, 255-263 (1980)

Bizzini, B.: Tetanus toxin structure as a basis for elucidating its immunological and neuropharmacological activities, p. 177-218. In P. Cuatrecasas (ed.). The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. Receptors and recognition, series B, vol. 1. Capmann and Hall, London (1976)

Bizzini, B.: Properties of the binding to gangliosides and synaptosomes of a fragment of the tetanus toxin molecule p. 961-969. In P. Rosenberg (ed.) Toxins: animal, plant and microbial (Proceedings of the Fifth International Symposium). Pergamon Press, Oxford and New York. (1977)

Bizzini, B.: Chemical Studies on an Pharmacologically active polypeptid Fragment isolates from Tetanus Toxin.
Toxicon 15, 141, (1978)

Bizzini, B.: Tetanus Toxin.
Microbiol. Rev., 43, 224-240 (1979)

Bizzini, B.and M. Raynaud: Etude immunologique et biologique de sous-unités de la toxin tétanique.
C.R. Acad. Sci. 279, 1809-1812 (1974)

Bizzini, B. and M. Raynaud: Studies on the antigenic structure of tetanus toxin.
Ann. Inst. Pasteur Paris 126, 159-176 (1975)

Bizzini, B. and M. Raynaud: Activité biologique et immunologique de fragment de la toxine tétanique.
In Proceedings of the Fourth International Conference on Tetanus, Dakar, April 6-12, Fondation Mérieux, Ed. and Publisher, Lyon. p. 631-637 (1975)

Bizzini, B., K. Stöckel and M. Schwab: An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: chemical characterization, binding to gangliosides and retrograde axonal transport in various neuron systems.
J. Neurochem. 28: 529-542 (1977)

Bizzini, B., A. Turpin and M. Raynaud: On the structure of tetanus toxin.
Nauvyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276: 271-268 (1973)

Blake, P.A. and R.A. Feldmann: Tetanus in the United States 1970-1971.
J. Inf. Dis. 131: 745 (1975)

Bytchenko, B.: Tetanus as a world problem.
In L. Eckmann "Principles on Tetanus" Verlag Huber, Bern und Stuttgart (1967)

Byttacharyga, H.,-: Naturally acquired immunity against tetanus in man and animals.
Indian J. of Animal Health, 15: (2) 89-92 (1976)

Cherubin, C.E.: Epidemiology of tetanus in narcotics addicts.
New York State J. Med. 70: 267 (1970)

Coleman, G.: Studies on the regulation of extracellular enzyme formation by Bacillus subtilis.
J. Gen. Microbiol. 49: 421-431 (1967)

Coleman, G., S. Brown and D.A. Stormonth: A model for the regulation of bacterial extracellular enzyme and toxin biosynthesis.
J. Theor. Biol. 52: 143-148 (1975)

Collingridge, -: Effect of tetanus toxin on transmitterrelease from the substantia nigra and striatum in vitro.
J. Neurochem. 34 (3): 540-547 (1980)

Cronau, P.: Lokale Schutzimpfung von Pferden gegen Tetanus.
Vet. med. Diss. München (1978)

Craven, G.J. and D.J. Dawson: The chain composition of tetanus toxin.
Biochem. Biophys. Acta 317: 277-285 (1973)

Dimpfel, W., J.H. Neal and E. Habermann: ^{125}I-Labelled Tetanus-Toxin as a Neuronal Marker in Tissue Cultures Derived from Embryonic CNS.
Nauvyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290: 329-333 (1975)

Dimpfel, W., R.T.C. Huang and E. Habermann: Gangliosides in nervous tissue cultures and binding of ^{125}I-Labelled Tetanus Toxin, a Neuronal Marker.
J. Neurochem. 29: 329-334 (1977)

Eckmann, L.: Tetanus, Prophylaxis and Therapy.
Grune & Straton Verlag, New York-London (1963)

Erdmann, G. und E. Habermann: Histoautoradiography of central nervous system in rats with generalized tetanus due to ^{125}I-labelled toxin
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
301: 135-138 (1977)

Erdmann, G., H. Wiegand and H.H. Wellhöner: Intraaxonal and extraaxonal transport of ^{125}I-tetanus toxin in early local tetanus.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
290: 357-373 (1975)

Eyrich, K.: Die Klinik des Wundstarrkrampfes im Lichte neuzeitlicher Behandlungsmethoden.
Anaesthesiologie und Wiederbelebung, Bd. 43: (1969)

Fey, H. und G. Stiffler-Rosenberg: Messungen von Tetanus-Antitoxin beim Pferd mit dem Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA).
Schweiz. Arch. Tierheilk. 119: 437-446 (1977)

Finger, H., E. Habermann, K. Bracharz und H. Hof: Tetanus-Immunität im Senium.
Zbl. Bak. Hyg., I. Abt. Orig. B 161:
188-193 (1975)

Fischer, G.W., P. Sunakorn and C. Duangman: Otogenous tetanus.
Am. J. Dis. Child. 131: 445 (1977)

Frühwein, N. u. V. und Hochstein-Mintzel: Bestimmung von Tetanus-Antikörpern im menschlichen Serum mit dem ELISA-Test (Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay).
Ärztl. Lab. 26: 271-274 (1980)

Green, J., G. Erdmann and H.H. Wellhöner: Is there retrograde axonal transport of tetanus toxin in both α- and γ-fibres?
Nature, 265: 370 (1977)

Griffith, A. H.: Clinical reactions to Tetanus Toxoid
In: L. Eckmann: "Principles on Tetanus"
H. Huber Verlag, Bern, Stuttgart (1967)

Habermann, E.: Pharmakokinetische Besonderheiten des Tetanustoxins und ihre Beziehung zur Pathogenese des lokalen bzw. generalisierten Tetanus.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
267: 1-9 (1970)

Habermann, E.: Distribution of ^{125}I-tetanus toxin and ^{125}I-toxoid in rats with lokal tetanus, as influenced by antitoxin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
272: 75-88 (1972)

Habermann, E.: Distribution and elimination of ^{125}I-Tetanus toxin in rats.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
276: 341-359 (1973)

Habermann, E. and W. Dimpfel: Distribution of ^{125}I-tetanus toxin and ^{125}I-toxoid in rats with generalized tetanus, as influenced by antitoxin.
Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
276: 327-340

Habermann, E., W. Dimpfel and K.O. Räker: Interaction of labeled tetanus toxin with substructures of rat spinal cord in vivo.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
276: 361-373 (1973)

Habermann, E., F. Dreyer and H. Bigalke: Tetanus Toxin Blocks the Neuromuscular Transmission in vitro Like Botulinum A Toxin.
Nauvyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
311: 33-40 (1980)

Habermann, E. and H.H. Wellhöner: Advances in tetanus research.
Klin. Wschr. 52: 255-265 (1974)

Habermann, E., H.H. Wellhöner and K.O. Räker: Metabolic fate of ^{125}I-tetanus toxin in the spinal cord of rats and cats with early local tetanus.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
299: 187-196 (1977)

Habig, W.H., E.F. Grollmann, F.D. Ledley, M.F. Meldolesi, S.M. Aloj, M.C. Hardegree and L.D. Kohn: Tetanus toxin interactions with the thyroid: decreased toxin binding to membranes from a thyroid tumor with a thyreotropin receptor defect and in vivo stimulation of thyroid function.
Endocrinology 102: 844-851 (1978)

Hara, T., M. Matsuda and M. Yoneda: Isolation and some properties of nontoxigenic derivatives of a strain of Clostridium tetani.
Biken J. 20: 105-115 (1977)

Helting, T.B., S. Parschat and H. Engelhardt: Structure of Tetanus Toxin. Demonstration and separation of a spezific Enzyme converting intracellular Tetanus Toxin to the Extracellular Form.
J. Biol. Chem. 254: 1028-1033 (1979)

Helting, T.B. and O. Zwisler: Structure of tetanus toxin: Immunological distinction between polypeptide fragments.
In: Proceedings of the Fourth International Converence on Tetanus, Dakar, April 6-12. Fondation Mérieux Ed. and Publisher, Lyon p. 639-646 (1975)

Helting, T.B., O. Zwisler and H. Wiegandt: Structure of tetanus toxin. II. Toxin binding to ganglioside.
J. Biol. Chem. 252: 194-198 (1977)

Kalich, J.: Experimentelle Studien zur Pathogenese des Tetanus.
Vet. med. Habilitationsschrift München (1955)

Kerr, J.H., J.L. Corbett, C. Prys-Roberts, A. Crampton Smith and J.M.K. Spalding: Involvement of the sympathetic nervous system in tetanus.
Lancet 88: 236-241 (1968)

Kubiny, L. und G. Lendvai: Beitrag zur Gestaltung der Tetanus Situation in Ungarn.
Ärztl. Wschr. 114: 1869-1874 (1973)

Kryzhanovsky, G.N.: The Neural Aktion of Tetanus-Toxin. in Proc. 4. Int. Conf. on Tetanus, April 6-12 Dakar, Ed. Fondation Mérieux, Ed. u. Publisher, Lyon. p 189-199 (1975)

Ledley, F.D., G. Lee, L.D. Kohn, W.H. Habig und M.C. Hardegree: Tetanus toxin interactions with thyroid plasma membranes. Implication for structure and function of tetanus toxin receptors and potential pathophysiological significance.
J. Biol. Chem. 252: 4049-4055 (1977)

Lettl, A., K. Nekvasilova, K. Moravec and A. Stejskal: Etude de la toxingénèse chez Plectrium tetani III. Synthèse intracellulaire du précurseur et son activation. Ann. Inst. Pasteur Paris 111: 615-621 (1966)

Matsuda, M. and M. Yoneda: Structure-Funktion relationship of Tetanus Neurotoxin molecule: Analyses with complementary polypeptide fragments and a subfragment. In Proc. of the 5. Int. Symp. on animal, plant and microbial Toxins held in San José, Costa Rica, Aug. 1976. Ed. P. Rosenberg Toxins; Pergamon Press (1977)

Matsuda, M. and M. Yoneda: Antigenic substructure of tetanus neurotoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 68: 668-674 (1977)

Mattos, A.G.: 13 anos de companha contra o tetano umbilical. Pediat. prot. (S. Paulo) 33: 269-276 (1962)

Mayr, A., G. Baljer, E. Baljer und J. Sailer: Controlled field trials with oral and nasal immunization against tetanus in humans. Develop. biol. Standard, Vol 41: 43 S. Karger Basel (1978)

Mellanby, J.: The effect of glutamate on toxin production by Clostridium tetani. J. Gen. Microbiol. 54: 77-82 (1968)

Nielsen, K.E.: Growth and Toxin Production by Clostridium tetani.
Symp. Ser. Immunobiol. Scand. 3: 207-216 (1966)

Nielsen, K.E.: Biosynthetic stability of the toxigenetic capacity of Clostridium tetani on repeated transfer in culture media.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 77: 542-554 (1969)

Nickel, R., A. Schummer und E. Seiferle: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band IV. S. 27-48
Verlag Paul Parey (1975)

Nishida, S., T. Yamagishi, K. Tamai, I. Sanada and K. Takahashi: Effects of heat selection on toxigenicity, cultural properties and antigenic structures of clostridia.
J. Infect. Dis. 120: 507-516 (1969)

Pavlova, I.B. and T.I. Sergeeva: Ultrastructure of toxigenic and nontoxigenic strains of Cl. tetani.
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 46: (4) 12-15 (1969)

Price, D.L., J. Griffin, A. Young, K. Peck and Stocks: Tetanus toxin, direct evedence for retrograde intraaxonal transport.
Science 188: 945-947 (1975)

Regamey, R.H.: The metabolism of Pl. tetani and its relations to prophylactic and therapeutic agents.
In L. Eckmann: Principles on Tetanus
H. Huber Verlag: Bern, Stuttgart (1967)

Rey, M., M. Armengaud and I. Diop Mar: Tetanus in Dakar-
Epidemiological considerations
In L. Eckmann: Principles on Tetanus
H. Huber Verlag; Bern, Stuttgart (1967)

Robinson, J.P., J.B. Picklesimer and D. Puett:
Tetanus toxin. The effect of chemical
modifications on toxicity immunogenicity
and conformation.
J. Biol. Chem. 250: 7435-7442 (1975)

Russel Martin, R.: Clostridium tetani
In: Infectious Diseases and their etiologic
agents Part III. P. 1864-1870
Ed. Mandel, G.L., R.G. Douglas, J.E. Bennet
Pub. J. Willeys Sons, New York, Chichester
(1979)

Sakurai, N.: The relation between human and veteri-
nary Tetanus in a Japanese prefecture.
In L. Eckmann: Principles on Tetanus
H. Huber Verlag; Bern, Stuttgart (1967)

Schebitz, H. und W. Brass: Allgemeine Chirurgie für
Tierärzte und Studierende S. 168-178.
Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg (1975)

Schwab, M.E., and H.Thoenen: Selective trans-synaptic
migration of tetanus toxin after retrograde
axonal transport on peripheral sympathetic
nerves: a comparison with nerve growth factor.
Brain Res. 122: 459-474 (1977)

Schwab, M.E. and H. Thoenen: Selective binding, uptake,
and retrograde transport of tetanus toxin
by nerve terminals in the rat iris.
J. Cell Biol. 77: 1-13 (1978)

Semba, T. and M. Kano: Glycin in the Spinal Cord of Cats with Local Tetanus Rigidity. Science, 164: 571-572 (1969)

Sergeeva, T.I. and K.I. Matveev: Geographical distribution of Clostridium tetani in the soil of the USSR. In L. Eckmann: Principles on Tetanus H. Huber Verlag Bern, Stuttgart (1967)

Shoesmith, J.G. and K.T. Holland: The germination requirements of spores of Clostridium tetani. Proc. Biochem. Soc. Dezember: 14-15 (1972)

Smith, L.D.: Occurence of Clostridium botulinum and Cl. tetani in the soil of the United States. Health Laboratory Science 15: (2) 74-80 (1978)

Smith, J.W.G. and A.G. Mac Iver: Growth and toxin production of tetanus bacilli in vivo. J. Med. Microbiol. 7: 497-504 (1974)

Stöckel, K., M. Schwab and H. Thoenen: Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. Brain Res. 99: 1-16 (1975)

Tokano, K. und M. Kano: Gamma-Bias of the muscle Poisoned by Tetanus Toxin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276: 413-420 (1973)

van Heyningen, S: Binding of ganglioside by the chains of tetanus toxin. FEBS Lett. 68: 5-7 (1976)

van Heyningen, W.E.: The fixation of tetanus toxin by ganglioside.
J. Gen. Microbiol. 24: 107-119 (1961)

van Heyningen, W.E.: The Bipartite Toxins: Exciting New Developments.
Toxicon 16: 142-143 (1978)

van Wezel, A.L.: De Produkte von Tetanos Toxin in Homogene Kweken Overgedrukt.
Versl. Meded. Volksgezond. 12: 1-4 (1967)

Veronesi, R.: Epidemiology of Tetanus
In L. Eckmann: Principles on Tetanus
H. Huber Verlag; Bern, Stuttgart (1967)

Veronesi, R., H. Cecin, A. Corrêa, J. Tavares, C. Moraes, O.J. Bertoldo: New Concepts on tetanus Immunization: Naturally Acquired Immunity.
J. Hyg., Epidem. (Praha)
19: (1) 126-134 (1975)

Volgin, Yu.B., I.B. Pavlova and K.L. Shahanina: Obtaining of specific ferroglobulin to tetanospasmin and electron microscopic study of the process of toxinogenesis in C. tetani.
Zh. Mikrobiol. (Mosk.)
51: (2) 79-83 (1974)

Vos, J.G., J. Buys, J.G. Hanstede and A.M. Hagenaas: Comparison of Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay and Passive Hemagglutination Method for Quantification of Antibodies to Lipo-polysaccharide and Tetanus Toxoid in Rats.
Infect. Immunity 24: 798-803 (1979)

Wannacott, S. and R.M. Marshbanks: Inhibition by botulinum toxin of depolarization evoked release of ^{14}C-acetylcholine from synaptosomes in vitro.
Biochem. J. 156: 701-712 (1976)

Watkins, J.C.: Metabolic Regulation in the Release and Action of Excitatory and Inhibitory Amino Acids in the Central Nervous System.
Biochem. Soc. Symp. 36: 33-47 (1972)

Wellhöner, H.H., B. Hensel and U.C. Seib: Local tetanus in cats: neuropharmacokinetics of ^{125}I-tetanus toxin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276: 375-386 (1973)

Weinstein, L.: Tetanus.
N. Engl. J. Med. 289: 1293 (1973)

WHO Weekley Epidemiological Record: Tetanus in the caribean area.
55:(33) 254 (1980)

Wiegand, H. and H.H. Wellhöner: Electrical Excitability of Motoneurons in Early Local Tetanus.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308: 71-75 (1979)

Williams, K.: Some observations on Clostridium tetani.
Med. Lab. Technol. 28: 399-403 (1971)

Willis, A.T. and K. Williams: Some cultural reactions of Clostridium tetani.
J. Med. Microbiol. 3: 291-301 (1970)

Wilson, G.S. and A.A. Miles: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, es. 4. Baltimor, Williams and Wilkins, (1955) pp. 1955-1981

World Health Statistica Annual 1971 Hsg. WHO Genf

Zimmermann, J.M.: Structure-function relationship of the pathogenesis of tetanus: Activity of the toxin at the membranar level. Ph. D. thesis, Faculté des science Université Genéve (1977)

Zimmermann, J.M. and J.-C. Piffaretti: Interaction of tetanus toxin and toxoid with cultured neuroblastoma cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296: 271-277 (1977)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. DDr. h.c. Anton Mayr für die Überlassung des Themas und für wertvolle Hinweise danken.

Ferner danke ich Herrn Dr. Dr. habil. Georg Baljer für die Hilfe bei der Anfertigung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 14. Mai 1950 wurde ich als zweiter Sohn des Maschineningenieurs Max-Kurt Haßlacher und seiner Frau Marta, geb. Fleischhauer, in Castrop-Rauxel geboren.

1954 zogen wir nach Wattenscheid um. Dort besuchte ich ab 1957 die Volksschule und ab 1960 das Städtische Jungengymnasium. Die letzten drei Schuljahre absolvierte ich an der Uplandschule in Willingen/Waldeck, an der ich am 4.6.1971 die Allgemeine Hochschulreife erhielt.

Ab 1.7.1971 leistete ich meine Wehrpflicht in einem Panzerbataillon ab.

Im November 1972 begann ich ein zweijähriges Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Im Herbst 1974 wurde ich zu einer zweimonatigen Wehrübung einberufen, nach deren Beendigung ich zum Leutnant der Reserve befördert wurde.

An der Ludwig-Maximilians-Universität München begann ich im November 1974 das Studium der Tiermedizin, welches ich am 29. November 1979 mit dem Staatsexamen abschloß. Am 1. März 1980 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.